

Untersuchungen zur Pathogenese
der Bakteriellen Nierenerkrankung
(BKD) der Salmoniden,
mit besonderer Berücksichtigung
des Herzens

Masahiro Ogawa

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0086

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf
Prof. Dr. W. Ahne

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof.Dr.Dr.habil.R. Hoffmann

Untersuchungen zur Pathogenese der Bakteriellen Nierenerkrankung
(BKD) der Salmoniden, mit besonderer Berücksichtigung des Herzens.*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Masahiro Ogawa
aus
Tokyo

*Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten dankenswerterweise
unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: _____ Prof. Dr. Dr.habil. R. Hoffmann

Korreferent: _____ Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 29. Juli 1988 _____

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I.	Einleitung 1
II.	Literaturübersicht 2
III.	Eigene Untersuchungen 20
III A.	Material und Methoden 20
III A 1.	Versuchstiere 20
III A 2 a.	Bakterien und Medien 20
III A 2 b.	Methoden 22
III A 3.	Zeitplan 22
III A 4.	Versuchsanordnung 23
III A 5.	Lichtmikroskopie 24
III A 6.	Elektronenmikroskopie 24
III A 7.	Immunhistologie 25
III A 7 a.	DAB-Methode 26
III A 7 b.	DAB-Cobalt-Methode 26
III A 7 c.	AEC-Methode 26
III A 7 d.	Chloro-Naphthol-Methode 26
III A 8.	Bakteriologie 27
III A 9.	Indirekte Immunofluoreszenz (IFAT) 27
III A 10.	IFAT bei Organabklatschpräparaten und entparaffinierten histologischen Schnit- ten 27
III B	Ergebnisse 29
III B 1.	Klinischer Verlauf und Symptomatik 29
III B 2.	Pathologisch-anatomische Befunde 29
III B 3.	Lichtmikroskopische Befunde am Herzen 33
III B 4.	Elektronenmikroskopische Befunde am Herzen 48
III B 5.	Mikroskopische Befunde an den übrigen Organen 57
III B 6.	Bakteriologie 66
IV.	Besprechung der Ergebnisse und Diskus- sion 67
V.	Zusammenfassung 70
VI.	Summary 71
VII.	Literaturverzeichnis 72

I. Einleitung

Die bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD) wird von *Renibacterium salmoninarum* verursacht (SANDERS und FRYER, 1980). Sie stellt eine systemische chronische bakterielle Infektion der Salmoniden dar (FRYER und SANDERS, 1980; BRUNO und MUNRO, BRUNO et al., 1982, KLONTZ, 1982).

Die Erkrankung verläuft schleichend. Wegen der hohen Verluste und der Schwierigkeiten in der Therapie ist die bakterielle Nierenerkrankung eine wirtschaftlich wichtige Krankheit von Wild- und Zuchtfischen (BULLOCK et al., 1975; BANNER et al., 1983; KETTLER et al., 1987).

Seitdem diese Erkrankung im Jahre 1930 beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) von MACKEY et al., (1933) gefunden wurde, wurde sie bei zahlreichen Vertretern der Familie Salmonidae beobachtet. Die bakterielle Nierenerkrankung ist in den USA, Kanada, England, Schottland, Frankreich, Japan, Irland, Italien, Spanien und Jugoslawien bekannt (FRYER und SANDERS, 1981).

Im Jahre 1984 berichteten HOFFMANN et al. erstmalig über die bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden in Deutschland.

In den meisten Veröffentlichungen werden Degenerationen in der Niere beschrieben (EARP et al., 1953; SNIEZKO und GRIFFIN, 1955; SMITH, 1964; YOUNG und CHAPMAN, 1978). Wenige Veröffentlichungen erwähnen Veränderungen der übrigen Organe insbesondere des Herzens (WOOD und WOLLIS, 1955; BRUNO und MUNRO, 1986).

Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit besonders Herzveränderungen nach künstlicher BKD-Infektion untersucht werden.

II. Literaturbesprechung

Bacterial Kidney Disease (BKD, bakterielle Nierenerkrankung)
der Salmoniden

Die bakterielle Nierenerkrankung (BKD, Bacterial Kidney Disease), die durch *Renibacterium salmoninarum* verursacht wird, ist eine systemische bakterielle Infektion der Salmoniden (FRYER und SANDERS, 1981).

Erreger

Der Erreger der BKD ist ein grampositives, unbewegliches, katalase-positives, aerobes, sporenloses, nicht säurefestes, kokkoides Stäbchen (SMITH, 1964; KIMURA, 1978; AUSTIN und RODGERS, 1980; SANDERS und FRYER, 1980).

Die frühere Zuordnung zu den Coryneformen mit der Bezeichnung *Corynebacterium salmoninus* (ORDAL und EARP, 1956) wurde wegen des Aufbaus der Zellwandstruktur, wegen verschiedener biochemischer Unterschiede und wegen des Fehlens metachromatischer Granula aufgegeben (YOUNG und CHAPMAN, 1978; SANDERS und FRYER, 1980).

Heute wird es als *Renibacterium salmoninarum* bezeichnet (SANDERS und FRYER, 1980).

Um dieses Bakterium anzüchten zu können, ist die Zugabe von L-Cystein zum Kulturmedium essentiell (ORDAL und EARP, 1956; WOLF und DUNBAR, 1959 a). Trotzdem wächst das Bakterium auf diesem Spezialnährboden bei günstiger Temperatur (15 - 18°C) nur sehr langsam. Nach 4 - 10 Tagen (maximal 3 - 4 Wochen) sind bei der Anzucht Kolonien sichtbar (EVELYN et al., 1973). Das Bakterium kann nur im Temperaturbereich von 5°C bis 22°C wachsen. Ein Wachstum erfolgt bei 37°C nicht mehr (SMITH, 1964; KIMURA, 1978; SANDERS und FRYER, 1981; KLONTZ, 1982).

Vorkommen

Der erste Bericht über die bakterielle Nierenerkrankung wurde von MACKIE et al. im Jahre 1933 in Schottland angefertigt. Atlantische Lachse (*Salmo salar*), die aus den Flüssen Dee und Sprey stammten, waren befallen. Diese Erkrankung wurde von SMITH im Jahre 1964 "Dee Disease" genannt.

Ein Übertragungsversuch auf die Bachforelle (*Salmo trutta*) durch subkutane bzw. intramuskuläre Injektion von Organmaterial der befallenen Lachse verlief positiv (ARKWRIGHT und PRYCE-TANNATT, 1933). In den Jahren 1933 - 34 trat die Krankheit bei Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) und Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) in einer staatlichen Fischzucht in Massachussetts (USA) zum ersten Mal auf (BELDING und MERRILL, 1935).

BELDING und MERRILL (1935) beobachteten bei allen befallenen Fischen neben Hautveränderungen und Organabszessen einen beidseitigen Exophthalmus.

Als Erreger konnte ein kleines, gram-positives Bakterium in den Organpräparaten nachgewiesen werden. Jedoch hatten sie beschrieben, daß der Erreger beweglich sei.

In den Jahren 1953 - 60 gab es zahlreiche Fälle aus Schottland, den USA und Kanada. RUCKER et al. (1953) und EARP et al. (1953) beschrieben die Krankheit bei pazifischen Lachsen (Gattung: *Oncorhynchus*) sowohl in Fischzuchten, als auch in Freigewässern in den USA.

SNIEZKO und GRIFFIN (1955) berichteten über BKD bei Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*), Bachforellen (*Salmo trutta*) und Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) in den Staaten New Hampshire und New York. MC LEAN und YODER (1970) berichteten über die BKD im Staate Michigan bei pazifischen Lachsarten (*Oncorhynchus tshawytscha*, *O.kisutch* und *O.nerka*), Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) und Seeforellen (*Salvelinus namaycush*).

Aus Westkanada liegen erste Berichte über erkrankte Pink-Lachse (*Oncorhynchus gorbuscha*) von BELL (1961) und über Atlantische Lachse (*Salmo salar*) aus Ostkanada in den Jahren 1957 - 69 von PIPPY (1969) vor. In Italien isolierten GHITTINO et al. (1977) den Erreger aus Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) einer Fischzucht; im selben Jahr 1973 stellte FIJAN (1977) BKD bei Regenbogen- und Bachforellen in Jugoslawien fest.



MILLAN (1977) führte in Spanien von Fischen aus Lachszuchtanstalten den kulturellen Nachweis der Krankheit durch.

KINKELIN (1974), ALDRIN et al., (1977) und VIGNEUILLE et al. (1977) beschrieben in Frankreich bei den pazifischen Lachsarten (*Oncorhynchus tshawytscha* und *O. kisutsch*) Fälle von BKD. Berichte aus Japan stammten von KIMURA und ARAKAWA (1977); sie führten pathologisch-anatomisch, histologisch, kulturell und serologisch den Nachweis der BKD auf Hokkaido bei dort gezüchteten pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus nerka*, *O. tshawytscha*, *O. gorbuscha*, *O. masou*) durch.

In der Bundesrepublik Deutschland wurde die BKD zum ersten Mal von HOFFMANN et al. (1984) bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*), Silberlachsen (*O. kisutsch*) und Bachforellen (*Salmo trutta*) in einer Teichwirtschaft und einem zugehörigen Freigewässer beschrieben. Zahlreiche weitere BKD-Fälle im süddeutschen Raum und in Tirol wurden von PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 a, b) geschildert.

Pathogenese

Der Verlauf der Erkrankung kann, abhängig von der Virulenz des Erregers, den inneren (z.B. Abwehr des Wirtes, Alter, Konstitution und genetischer Disposition) und äußeren Faktoren (z.B. Ernährung, Stress, Wasserqualität und Temperatur) akut, subakut oder wie in den meisten Fällen, chronisch sein (FRYER und SANDERS, 1981).

Aus den USA und Kanada sind Massenerkrankungen bei Atlantischen Lachsen (*Salmo salar*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) nach dem Umsetzen in Meerwasser bekannt (EARP et al., 1953, LILIER et al., 1981; PATERSON et al., 1981; BANNER et al., 1986).

Die wichtigsten Infektionswege sind die vertikale Infektion durch infizierte Eier und die horizontale, durch subklinische Bakterienträger (WEDEMEYER, 1973 und 1976; KLONTZ, 1982; EVELYN et al., 1984; SCHAUNER, 1986).

Klinik der BKD

Diese Erkrankung befällt ältere und jüngere Fische. Einjährige Fische werden besonders stark geschädigt (RUCKER et al., 1953). Der Verlauf der Krankheit ist im allgemeinen chronisch, dabei ist die Mortalität hoch.

In Japan zum Beispiel ist die BKD bei einjährigen Fischen von *Oncorhynchus tshawytscha* und *Oncorhynchus nerka* var. *adonis* von August bis Februar aufgetreten, dabei starben 70 % der Fische (KIMURA und ARAKAWA, 1977).

Erste Anzeichen für eine Erkrankung sind meist niedrige Wachstumsraten und ab dem Setzlingsalter eine allmähliche Häufung von Ausfällen (KLONTZ, 1982; RICHARDS, 1984).

Die makroskopisch erkennbaren Krankheitsanzeichen sind variabel. Im Frühstadium verläuft die Krankheit oft ohne äußere Symptome (BULLOCK et al., 1975).

Bei weiterem Fortschreiten kommt es zum ausgeprägten Exophthalmus ein- oder beidseitig (HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a, b). Augenveränderungen, Kornea- und Linsentrübung und der Verlust des Augapfels werden im fortgeschrittenem Stadium festgestellt. Die leere Orbita ist mit blutigem oder grauweißem Granulationsgewebe gefüllt (BULLOCK et al., 1971; GHITTINO et al., 1977; MITCHUM und SCHERMANN, 1981; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a; SCHAUNER et al., 1985).

Diese Veränderungen sind besonders bei Regenbogenforellen sehr häufig. Jedoch auch bei pazifischen Lachsen (BELL, 1961; MC LEAN und YODER, 1970; HENDRICKS und GRIFFIN, 1955; WARREN, 1984) werden diese Veränderungen beschrieben.

Daneben kommt es immer wieder zu akuten Ausbrüchen mit hohen Mortalitäten. Hieran sind exogene und endogene Faktoren beteiligt. So wurde im Freiland und in Teichwirtschaften Massensterben vor oder bei Eintritt der Laichzeit bei Bach- und Regenbogenforellen und Seesaiblingen beobachtet (PFEIL-PUTZIEN et al., 1985).

Wie alle Autoren außer MITCHUM und SHERMAN (1981) beobachteten, werden auf der Haut oft kleine, subkutane abgegrenzte Ödeme festgestellt. In diesen unregelmäßig geformten Ödemen wird cremefarbiger oder roter Eiter beobachtet.

Die Flossen (häufig Fettflossen und Brustflossen), die Gelenke der Flossen und der Anus sind teilweise blutig. Außerdem ist eine Umfangsvermehrung der Leibeshöhle zu beobachten (HENDRICKS und LEEK, 1975).

Pathologisch - anatomische Veränderungen

Typische Veränderungen lassen sich in der Niere feststellen. Weiße stecknadelkopf- bis hirsekorngroße Punkte befinden sich in ihr. Sie werden nach und nach größer bis hin zu millimetergroßen Herden. Diese Herde verschmelzen teilweise mit anderen (EGUSA, 1984). Schließlich erreichen sie eine bohnen- bis grobhöckerige Form mit dickflüssigem Inhalt. Solche Herde sind oft im kaudalen Bereich

der Niere erkennbar. Die Niere schwillt an und verfärbt sich weißlich (BULLOCK et al., 1971; FIJAN, 1977; MITCHUM und SHERMAN, 1981; HOFFMANN et al., PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b; SCHAUNER et al., 1985). Ähnliche Herde lassen sich auch in Milz, Herz, Pankreas und im Verdauungskanal erkennen (BELL, 1961; BULLOCK et al., 1971; FIJAN, 1977; GHITTINO et al., 1977; HOFFMANN et al., 1984). Die Milz ist vergrößert. Die Leber verfärbt sich hell. Der hintere Teil des Darms bläht sich oft auf und beinhaltet weiße oder gelbliche Flüssigkeit. Petechiale Blutungen werden in den inneren Organen und auf den Serosen der Bauchhöhle festgestellt. In der Muskulatur sind Abszesse mit wässrigem Inhalt erkennbar.

In der Bauchhöhle sammelt sich bernsteinfarbige, fast klare oder rote und trübe Flüssigkeit an. Um die inneren Organe werden Pseudomembranen beobachtet (EGUSA, 1984). HOFFMANN et al., 1984 beobachteten bei frisch getöteten Fischen eine auffallende Blässe der Kiemen. In Hoden und Eierstöcken werden bei Regenbogenforellen rote Pünktchen festgestellt (BULLOCK et al., 1971). Bei Regenbogenforellen, Bachforellen und Coholachsen fallen regelmäßig deutliche Anzeichen einer Anämie auf (FIJAN, 1977; HOFFMANN, 1983; HOFFMANN et al., 1984).

Pathologisch - anatomische Veränderungen am Herzen

Bei Regenbogenforellen, Bachforellen und Coholachsen fällt eine Blässe des Herzens auf (FIJAN, 1977; HOFFMANN, 1983; HOFFMANN et al., 1984).

In der Endphase der Erkrankung ist das Herz mit weißlichen millaren oder nodulären Herden durchsetzt. Die Kammerwände sind verdickt, der Herzmuskel wird spröde und bekommt eine grau-bräunliche Farbe. Der Herzbeutel ist bei an BKD erkrankten Fischen gefüllt (BELL, 1961; SNIEZKO und GRIFFIN, 1955; WARREN, 1983). Undurchsichtige Pseudomembranen überziehen bei Bachsaiblingen das Herz (SNIEZKO und GRIFFIN, 1955).

Pathologisch - histologische Veränderungen

In der Mitte eines Granuloms der Niere oder anderer Organe lassen sich Nekrosen nachweisen, die aus normalem Gewebe, verändertem Gewebe, Makrophagen und vielen Bakterien zusammengesetzt sind. Die Niere weist teilweise große Herde käsiger Nekrosen und diffuse, interstitielle Granulome mit zum Teil verkäsendem Inhalt auf (HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b). Zudem werden die Nierentubuli dilatiert und mit amorphem Material gefüllt. Das hämatopoetische Gewebe der Niere ist herdförmig aufgelockert und die Pigmentmakrophagen sind deutlich vermehrt. Die Niere weist im interstitiellen Bindegewebe viele grampositive Bakterien und nekrotische Bereiche auf (HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b, KETTLER, 1987). In den meisten Fällen werden die Bakterien phagozytiert, jedoch können sie auch im Bindegewebe liegen. In Abklatschpräparaten der Herde lassen sich unzählige kleine Diplobazillen beobachten. In den infizierten Organen fällt die Zunahme der retikuloendothelialen Zellen auf. In stark befallenen Organen substituieren die Zellen des RES das Blutbildungsgewebe (EGUSA, 1984). Wenn das Parenchym (z.B. der Niere) von dieser Erkrankung befallen wird, werden Detritus und Nekrose im Gewebe festgestellt. Die Makrophagen sammeln sich, um die Bakterien zu phagozytieren. Die Bakterien vermehren sich, der Herd vergrößert sich und weitere Zellinfiltrationen von Makrophagen lassen sich erkennen. Histopathologisch könnte dies eine chronische, systemische, diffus-granulomatöse (histiozytäre) Entzündung genannt werden (WOLK, 1975). In der Milz stellte SMITH (1964) herdförmige Nekrosen beim atlantischen Lachs (*Salmo salar*) fest, die mit Zelldetritus gefüllt waren und peripher zahlreiche grampositive Bakterien enthielten. In der Leber fanden sich die granulomatösen Knoten im Bindegewebe zwischen den Leberparenchymzellen bei Königslachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*), Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) und Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) (WOOD und YASUTAKE, 1956; HENDRICKS und LEEK, 1975). Beim atlantischen Lachs (*Salmo salar*) stellte man in der Leber herdförmige Nekrosen fest (SMITH, 1964). 2 bis 3 Wochen nach künstlicher Infektion können in der Leber im perivaskulären Bindegewebe phagozytierte KD-Erreger gefunden werden. Die entzündliche Reaktion sowie das Ausmaß der Gewebszerstörung ist geringer als in der Niere bei Regenbogenforellen und atlantischen Lachsen (BRUNO, 1986).

Das retrobuläre Gewebe zeigte bei Augenverlust eine chronische Entzündung mit Granulationsgewebe, das von Leukozyten und Makrophagen infiltriert war (HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b). Bei Chinook-Lachsen beschrieben HENDRICKS und LEEK (1975) chronische knotige Veränderungen im postorbitalen Raum, die vorherrschend von proliferierenden Makrophagen und epitheloidem Gewebe sowie manchmal von fibrotischem Material gebildet werden. Trotz Einsprossung von Blutgefäßen in das entzündete Gewebe schien die Versorgung nicht ausreichend zu sein, da nekrotische Bereiche zu finden waren.

Die Augenmuskulatur war degeneriert und nekrotisch. Bei Regenbogenforellen und Coholachsen wurden häufig, nach Verlust des Augapfels, granulomatöse Veränderungen mit Makrophagen und Leukozyten in den Augenregionen gefunden (SNIEZKO und GRIFFING, 1955; SCHÄPERCLAUS, 1979; KLONTZ, 1982).

Entzündungserscheinungen ließen sich sowohl in den Kiemen, dem Magen-Darm-Trakt (erhöhte Zahl eosinophiler Granulozyten in der Muskelschicht und Peritonitis), als auch in der Skelettmuskulatur bei Regenbogenforellen, Silberlachsen und Bachsaiblingen feststellen (WOOD und YASUTAKE, 1956; HENDRICKS und LEEK, 1975).

Granulomatös-nekrotische Herde fanden sich auch in den Meningen, dem Gehirn, der Gallenblase und in der Schwimmblase (WOOD und YASUTAKE, 1956; HENDRICKS und LEEK, 1975).

Pseudomembranen beschrieben SMITH (1964) und KETTLER (1987) als eine auf der Organkapsel liegende, dünne Schicht, die viele Leukozyten enthielt und bis zu drei Schichten aufwies, wovon die äußerste Fibrin, kernhaltige Zellen, gram-positive Bakterien und die innerste viele Fibroblasten und Histiozyten enthielt (SMITH, 1964).

Als Todesursache der an BKD erkrankten Fische diskutierten BRUNO und MUNRO (1986) folgende Möglichkeiten: Direkte Gewebsschädigung durch Stoffe, die von Phagozyten freigesetzt werden oder/und möglicherweise Toxine des Erregers, Gewebsschädigung durch die proliferative Entzündung und daraus resultierende Nieren-, Leber- und Herzinsuffizienz.

Pathologisch - histologische Veränderungen am Herzen

BULLOCK et al., (1971) beschrieben perikardiale Erosionen. ELLIS et al., (1978) beobachteten bei Chinook Lachsen zahlreiche granulo-matöse Veränderungen am Herzen.

Bei vielen Fischen wurde eine chronische, herdförmige, nicht eitrige Myokarditis beschrieben (HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b).

Bei Königsachsen, Silberachsen und Bachsaiblingen ist der Herzmuskel durch eine massive Myokarditis schwer geschädigt (WOOD und YASUTAKE, 1956; HENDRICKS und LEEK, 1975).

BRUNO (1986) beobachtete, daß Zellen, die Bakterien phagozytiert hatten, innerhalb der ersten 2 Wochen vereinzelt im Herzlumen auftraten. Kurz darauf waren ebensolche zwischen den Herzmuskelbündeln zu finden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopisch wies YAMAMOTO (1975) bei BKD-kranken Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) und Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) in den Nierenzellen Bakterien nach, wobei er die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose und eine intrazelluläre Vermehrung mutmaßte.

YOUNG und CHAPMAN (1978) untersuchten die Niere von BKD-erkrankten Bachsaiblingen (Alter bis 17 Monate) mittels Elektronenmikroskopie. Parallel dazu wurden reine Bakterienpräparate für die elektronenoptische Untersuchung angefertigt. In den Nierenpräparaten werden hier Bakterien extrazellulär und intrazellulär in Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten und Pigmentzellen gefunden.

Manche Bakterien befinden sich auch intrazellulär in der Teilung (KETTLER, 1987).

Am Glomerulum sind spärliche bis reichliche Ansammlungen subendothelialer und mesangialer elektronendichter Ablagerungen von flockiger bis granulierter Konsistenz zu erkennen. Das mesangiale Gewebe zeigt Proliferationen. Fettähnliche Tropfen kommen in Endothelzellen sowie in Epithelzellen der visceralen und parietalen Blätter der Bowman'schen Kapsel vor.

Das Endothel der Kapillarschlingen weist Lücken auf und die Versorgung der viszeralen Epithelzellen scheint gestört zu sein. Die Basalmembran ist leicht verdickt und fleckig. Große strukturlose Blasen wölben sich aus Entothelzellen ins Lumen der Kapillaren vor und sind Anzeichen eines diffusen Zellödems (KETTLER, 1987).

In den Tubuluszellen sind die ersten erkennbaren Veränderungen hydropisch degenerativ. In proximalen und sistalen Tubuluszellen sind geschwollene Mitochondrien und ein erweitertes endoplasmatisches Retikulum zu erkennen. Irreversible Schäden wie geplatzte Mitochondrien, Veränderungen am Kern und an Lysosomen sowie zerrissener Bürstensaum oder Plasmalemausstülpung werden in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung beobachtet. Kollagen lagert sich an basalen Tubuluszellwänden an. In diesem Bereich erscheinen den sternförmigen Fibroblasten ähnliche Zellen mit eingelagerten fettähnlichen Tropfen ("fat like droplets").

Auch die Zellen des interstitiellen Bindegewebes enthalten diese "fettähnlichen Tropfen".

Laut MEADOWS (1973) wird diese fettige Degeneration als Zeichen einer akuten Zellschädigung angesehen und kommt auch beim nephrotischen Syndrom des Menschen vor.

Das untersuchte Krankheitsbild ähnelt nach YOUNG und CHAPMAN (1978) sehr stark den Nierenveränderungen der Säugetiere beim Vorliegen einer Proteinurie, eines nephrotischen Syndroms bzw. einer Glomerulonephritis.

Granulome der produktiv-proliferativen Form der TBC bei Säugern haben einen ähnlichen Aufbau wie die der chronisch verlaufenden BKD (KETTLER, 1987).

Die Bakterien zeigen ultrastrukturell am Gewebsschnitt wie im reinen Bakterienpräparat folgende Struktur (YOUNG und CHAPMAN, 1978): Ihre Form ist "bazillenähnlich". Die mittlere Region enthält helles, filamentöses, als DNS interpretiertes Material. Kleine elektronendichte Partikel, in Größe und Dichte Ribosomen entsprechend, füllen die Peripherie der Zellen aus.

Weiterhin vergleichen YOUNG und CHAPMAN (1978) und KETTLER (1987) die elektronenmikroskopisch erkennbaren Nierenveränderungen der an BKD erkrankten Fische mit ultrastrukturellen Ergebnissen anderer Autoren bezüglich Nierenerkrankungen bei Säugetieren.

Diagnose

Für die Diagnose der BKD stellen die Beobachtungen des klinischen Verlaufs und die makroskopisch erkennbaren Veränderungen am Fisch wichtige Faktoren dar (EGUSA, 1984). Weiter wird ein Abklatsch von der Niere hergestellt und nach Gram gefärbt. Kleine kokkoide, häufig in Paaren zusammenliegende Stäbchen, die an einem Nierenabklatsch, der nach Gram gefärbt wurde, festgestellt werden, sind typisch für BKD (*Renibacterium salmoninarum*) (EVELYN et al., 1973; GHITTINO, 1977; ELLIS et al., 1978; IWAMA und GREER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981). Um eine sichere Diagnose stellen zu können, ist eine Anzucht erforderlich, die jedoch länger dauert (EGUSA, 1984). Eine fluoreszenz-serologische Diagnose ist möglich, schnell und spezifisch (BULLOCK und STUCKEY, 1975; PATERSON et al., 1979; LAIDLER, 1980; EVELYN et al., 1981; LALLIER et al., 1981; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a und b). Wegen des einheitlichen Serotyps, der Empfindlichkeit und Schnelligkeit empfehlen sich serologische Untersuchungen (BULLOCK et al., 1974).

Nachweis des Bakteriums und Nachweis von Antikörpern

Bakteriennachweis am Paraffinschnitt

Die direkte Bakterienfärbung ist am histologischen Schnittpräparat möglich.

WOOD und YASUTAKE (1956) färbten Schnittpräparate mit einer modifizierten Wolbachs-Giemsa-Technik (LILLIE, 1948). Als modifizierte Gramfärbung, die ebenso an histologischen Präparaten verwendet wird, ist die Methode nach TAYLOR (1966) zu nennen (YOUNG und CHAPMAN, 1978); ferner die Gramfärbung nach BROWN und HOPPS (1973), die von HENDRICKS und LEEK (1975) angewandt wurde.

Bakteriennachweis im Organabklatschpräparat

Der Nachweis Gram-positiver Stäbchen bzw. Diplokokken durch Gramfärbung von Abklatschpräparaten veränderter Gewebe ist eine weitverbreitete Schnellmethode (BELDING und MERRILL, 1935; RUCKER et al., 1953; SNIEZKO und GRIFFIN, 1955; BELL, 1961; HUNN, 1964; MCLEAN und YODER, 1967; PIPPY, 1969; EVELYN et al., 1973; GHITTINO 1977; ELLIS et al., 1978; IWAMA und GREER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981). Die Gramfärbung ist bei geringer Bakterienzahl als unsicher anzusehen (SCHÄPERCLAUS, 1979; BULLOCK et al., 1980; KIMURA und YOSHIMITSU, 1981 a, b; LALLIER et al., 1981).

Wegen der geringen Empfindlichkeit und Spezifität, wird sie selten noch als einziges Hilfsmittel verwendet. Die Empfindlichkeit wird zum Teil dadurch eingeschränkt, daß der Erreger oft schwer von den in der Milz und Niere vorkommenden Melaninkörnchen der Pigmentmakrophagen unterschieden werden kann (CHEN et al., 1974; BULLOCK et al., 1974; BULLOCK et al., 1975; KIMURA et al., 1978; KIMURA et al., 1981). BRUNO und MUNRO (1982 und 1986) und KETTLER (1987) stellten bei ihren biochemischen Untersuchungen von *Renibacterium salmoninarum* fest, daß alle Isolate Glykogen enthalten, d.h. auch auf die PAS-Reaktion positiv reagieren.

Neueste Untersuchungen von FIEDLER und DRAXL (1986) zur Zellwandstruktur des *Renibacterium salmoninarum* ergeben, daß eine ausgeprägte äußere Schicht aus Polysacchariden das Bakterium umgibt.

Anzucht des Erregers

Die Anzüchtung von *Renibacterium salmoninarum* stellt ein sehr empfindliches diagnostisches Hilfsmittel dar (CIPRIANO et al., 1985). Bei der Entwicklung geeigneter Kulturmethode waren der Cystein- und Serum- bzw. Blutbedarf des Bakteriums und sein Temperaturoptimum bei 15 - 18°C entscheidend (KLONTZ, 1982). Um das Überwuchern der langsam wachsenden BKD-Erreger durch andere Keime zu verhindern, setzten AUSTIN et al., (1983) Antibiotika, gegen die die Erreger resistent sind, zu einem Cystein- und serumhaltigen Nährboden hinzu. Wegen der Hemmung des Wachstums vom KD-Erreger durch Nierengewebs-extrakte, empfehlen EVELYN et al., (1981) 50 % des gesamten Nierengewebes zu homogenisieren und nach dreimaligem Waschen und Zentrifugieren in Peptonwasser (1 % Pepton in 0.85 % NaCl-Lösung) zu suspendieren.

Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony

Die Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (OUCHTERLONY, 1958 und 1962; OUCHTERLONY und NILSSON, 1973; MAYR et al., 1977 b) ist eine Präzipitationsreaktion, die im halbfesten Medium durchgeführt wird. BULLOCK et al., (1974) und CHEN et al., (1974) führten diesen Test zum Nachweis von BKD-Bakterien in Organmaterial durch. KIMURA et al., (1978) modifizierten diese Methode. Die Doppelimmunodiffusion wird als eine schnelle und spezifische Nachweismethode für BKD-Bakterien empfunden (BULLOCK et al., 1974; CHEN et al., 1974; SCHÄPERCLAUS, 1979; FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982).

Immunofluoreszenzfärbung (IF)

Die Immunofluoreszenz basiert auf dem Nachweis eines Antigens mit Hilfe eines Fluorochrom-markierten Antikörpers, wobei durch kurzwelliges Licht eine Fluoreszenz des Immunkomplexes erzeugt wird (COONS et al., 1941 und 1942). Die IF zum Nachweis von *Renibacterium salmoninarum* kann an Bakterienabstrichen, Organabklatschpräparaten, Gefrier- und Paraffinschnitten ausgeführt werden (BULLOCK et al., 1980; SCHAUNER, 1986).

Sie kann als direkte oder als indirekte Methode durchgeführt werden.

Koagglutination

FORSGRÉN und SJÖQUIST (1966) stellten fest, daß die Fc-Fraktion der IgG-Moleküle an das Protein A eines Staphylococcus-aureus-Stammes (Cowan I) gebunden werden kann, ohne die Bindungsaktivität des Immunglobulins mit dem spezifischen Antigen zu stören.

KIMURA (1978) und KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a, b) beschrieben ein Koagglutinationsverfahren für den Nachweis von Renibacterium salmoninarum; dabei verwendeten sie als Protein-A-Träger eine stabilisierte Suspension des Staphylococcus-aureus-Stammes ATCC 12598 (Cowan I) und als Antikörper, Kaninchen-Anti-KD-Sera, die sie nach einer Methode von EDWARD und LARSON (1974) miteinander koppelten. Dadurch traten allerdings bei den Antiseren Agglutininverminderungen auf. Als nachzuweisendes Antigen diente Renibacterium salmoninarum in Form eines Hitze-extrahierten Antigens und als Hitzebehandelte Bakterienzellen.

Im Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren ist die Koagglutination nach KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a, b) eine relativ einfache Technik, deren Empfindlichkeit derjenigen von Doppelimmuno-diffusion und Gramfärbung entspricht.

Immunoenzym-Test

Vor kurzem wurden Immunoenzym-Tests entwickelt, um Fischpathogene Bakterien zu entdecken (SAKAI et al., 1987). Der ELISA-Test (Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay) wird häufig für BKD als Nachweismethode durchgeführt (KAATARI et al., 1986; PASCHO und MULCAHY, 1987). Die Dot-Blot-Methode, eine Variation des ELISA, wurde bei Renibacterium salmoninarum angewandt (SAKAI et al., 1987). Auch die direkte und indirekte-Methode, die Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) und die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC) wurden bei Renibacterium salmoninarum durchgeführt (SAKAI et al., 1986 und 1987).

Nachweis von Antikörpern

Die Agglutination ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Bildung von großen, dreidimensionalen Komplexen einhergeht. Da diese unlöslich sind, flocken sie aus und sedimentieren unter Bildung eines Niederschlags (MAYR et al., 1977b). Die Agglutination wurde bei der bakteriellen Nierenerkrankung der Salmoniden als Objektträgerschnellmethode (ROBERTS, 1978), als Mikrotitermethode und als Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH) getestet (SCHAUNER, 1986).

Immunelektrophorese

Mit der Immunelektrophorese wird Gewebe auf ein lösliches Antigen des KD-Erregers untersucht. Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Empfindlichkeit dieser Untersuchung sehr hoch (CIPRIANO et al., 1985).

Therapie

Zur Therapie der bakteriellen Nierenerkrankung sind Chemotherapeutika und Antibiotika eingesetzt worden (EARP und ORDAL, 1953). WOLF und DUNBAR (1959) empfehlen 100 mg Erythromycin pro kg Lebendgewicht per os für die Dauer von 21 Tagen. Clindamycin, Erythromycin, Kitamycin, Penicillin G und Spiramycin, befand AUSTIN (1985), können den Verlauf der BKD beeinträchtigen. KLONTZ (1978) empfiehlt die s.c. Injektion von Erythromycin-Phosphat als Behandlung. KIESER und HOSKINS (1983) führten an einem wertvollen Bestand von geschlechtsreifen Coho-Lachsen (*O. kisutch*) drei Erythromycin-Injektionen (20 mg/kg) durch. Nach dem Abtöten konnte der KD-Erreger in 21.7 % der Fische der Kontrollgruppe, im Gegensatz zu 0.6 % der mit Erythromycin injizierten Fische, identifiziert werden. Dennoch stehen der Aufwand und die Kosten einer Therapie mit Chemotherapeutika oder Antibiotika in den meisten Fällen nicht im Verhältnis zu der erwarteten Wirkung (ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985). Eine Resis-

tenzbildung des KD-Erregers könnte die Wirksamkeit solcher Therapien weiter einschränken. BELL (1985) konnte einen Erythromycin-resistenten Stamm des KD-Erregers isolieren.

Trophylaxe

Der Verlauf der Symptome ist im allgemeinen chronisch und befallene Fische gesunden kaum. Die kumulierte Mortalität der befallenen Gruppe ist hoch und noch dazu schwer zu therapieren.

Die Übertragung des Erregers über das Ei sowohl über die Schalenoberfläche als auch über das Eiinnere ist aus empirischen Beobachtungen und unter Laborbedingungen bekannt (KLONTZ, 1982; EVELYN, 1984).

Deshalb kann ein gesunder Bestand nur aus anerkannt seuchenfreien Betrieben aufgebaut werden.

Immunantwort der Salmoniden

Ähnlich dem Säuger, besitzen Fische eine humorale und eine zelluläre Immunität.

Alle Antikörper gehören zu der Gruppe der Serumproteine, die als Immunglobuline bekannt sind. Bei den Knochenfischen wurde nur eine Klasse von Immunglobulinen endgültig identifiziert. Diese Klasse ähnelt in vielen Aspekten jener Klasse, die bei den Säugetieren Makroglobulin oder IgM genannt wird (FLETCHER und GRANT, 1969; SHELTON und SMITH, 1970; STANWORTH und TURNER, 1973; LITMANN, 1975; ELLIS, 1982).

Die Immunglobuline beim Hundslachs (*Oncorhynchus keta*) besitzen alle ähnliche schwere Ketten und sind tetramer (KOBAYASHI et al., 1982). Beim Fisch werden Antikörper im Serum, in der Gewebeflüssigkeit und im Schleim (von Darm, Haut und Kiemen) gefunden.

Während die Höhe des Antikörpertiters auf dem Höhepunkt der Immunantwort vergleichbar mit der der Säugetiere ist, fand man heraus, daß der der Fische im allgemeinen eine längere induktive Phase hat. Der Anstieg des Titers erfolgt langsamer als bei den Säugetieren und Vögeln. Im allgemeinen ist man der Ansicht, daß die meisten Fischarten, die in Gewässern gemäßigter Temperatur leben, eine längere induktive Phase für die Antikörperbildung als die Warmwasserarten haben. Bei der Regenbogenforelle wurde bei optimalen Bedingungen über eine induktive Phase von zwei bis drei Wochen berichtet (ROBERTS, 1978).

Diese induktive Phase für eine Antikörperantwort könnte zu lang sein, um primäre Bedeutung innerhalb des Abwehrmechanismus zu besitzen. Jedoch wird der Sachverhalt durch den Hinweis klarer, daß die Antikörperbildung relativ lange Zeit beansprucht, um hohe nachweisbare, zirkulierende Titer zu erreichen. Trotzdem wird sie genauso schnell wie bei den höheren homöothermen Vertebraten in Gang gesetzt, d.h., in zwei bis drei Tagen.

KLONTZ (1972) berichtet, daß 2 - 3 Tage nach Injektion bakterieller oder viraler Antigene in Regenbogenforellen die Antigene in den grossen Lymphozyten und in den Makrophagen der Milz und Niere nachgewiesen werden konnten. Ein Ansteigen der Anzahl beider Zelltypen war um den 5. Tag nach Antigeninjektion zu beobachten und eine schwache Bildung von Antikörpern fand im Zytoplasma lymphoider Zellen der Kopfniere nach 12-15 Tagen statt. Wenige Tage vor dem Auftreten zirkulierender Antikörper enthielten die kleinen Lymphozyten der Kopfniere

beachtliche Mengen an Antikörpern im Zytoplasma. Es gibt einige von der Umgebung abhängige und physiologische Faktoren, die den Charakter der Antikörperantwort beeinflussen. Die Umgebungstemperatur ist für die wechselwarmen Wirbeltiere von besonderer Bedeutung. Niedrige Temperaturen verzögern oder verhindern die Antikörperproduktion vollständig. Die kritische Temperatur, unterhalb der die Immunantwort versagt, variiert bei den verschiedenen Arten und steht mit den natürlichen Temperaturbereichen ihrer Umgebung in Zusammenhang; z.B. bildet die Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) bei Temperaturen um 5°C Antikörper (ROBERTS, 1978). Bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) konnten trotz künstlich konstant gehaltener Umweltbedingungen von YAMAGUCHI et al., (1980) endogen verursachte, saisonale Schwankungen der Antikörperproduktion nachgewiesen werden.

AVTALION et al., (1973) berichteten, daß nur die Induktionsphase der Primärantwort temperaturabhängig ist und nicht die Freisetzung der Antikörper aus den Plasmazellen. Die Untersuchung von AVTALION (1973) zeigt, daß eine Antikörperproduktion solange normal fortschreitet, wie der Fisch für eine kurze initiale Periode bei Temperaturen über dem kritischen Wert mit dem Antigen Kontakt hatte, ungeachtet der Umgebungstemperatur.

Obwohl die erworbene spezifische Immunität bei Fischen eine Bedeutung für die Abwehr von Krankheiten besitzt, ist sie auf Grund der nachteiligen Temperaturabhängigkeit nicht von weitgehender Bedeutung. Die unspezifischen Abwehrmechanismen sind von größerer Bedeutung für den Fisch. Mittel, um die Effektivität der unspezifischen Abwehrmechanismen, wie das C-reaktive Protein, Interferon und Lysozym zu steigern, können sich für den Schutz der Fischbestände gegen pathogene Keime als fruchtbar erweisen (ROBERTS, 1978).

III. Eigene Untersuchungen

III. A Material und Methodik

III A 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 62 Regenbogenforellen (einjährig; Länge 12,5 - 21 cm; Gewicht 28 - 121 g) aus eigener SPF-Haltung verwendet. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Fische in 100 Liter Glas-aquarien gesetzt, um sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen. Klinische Krankheitsanzeichen wurden nicht beobachtet. Ent-chlortes Münchner Leitungswasser mit einer Härte von 16.4° dH, einer Durchschnittstemperatur von 10 °C und einem pH-Wert von 7.2 durchlief die Becken (zirka 2 Liter pro Min., d.h. Wassererneuerung 29 mal pro Tag).

Gefüttert wurde handelsübliches, pelletiertes Regenbogenforellen - Alleinfutter. Die Fische eines Versuches waren möglichst einheitlich in Größe und Gewicht.

III A 2 a. Bakterien und Medien

Die Bakterien des BKD-Stammes ATCC (American Type Culture Collection) 33209 wurden auf SKDM-Agar nach AUSTIN et al., (1983) bei 16-18 °C gezüchtet. Sie wurden in sterilem PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,2 suspendiert. In einer Zählkammer mit Einteilung nach NEUBAUER wurde die Zellzahl ermittelt und über weitere Verdünnungen mit PBS konnte die jeweilige Infektionsdosis hergestellt werden.

0.1 M Phosphatpuffer (PB) pH 7.4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	28.7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3 g

Aqua dest ad 1000 ml

0.01 M Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung pH 7.2

0.1 M PB	100 ml
NaCl	8.5 g
Aqua dest ad 1000 ml	

0.05 M Tris - HCl Puffer pH 7.6

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	1.39 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethan hydrochlorid	6.06 g

Aqua dest ad 1000 ml

Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung PBS (-) nach DULBECCO

NaCl	8.0 g/l
K Cl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.2 g/l

Aqua dest ad 1000 ml

DAB - Substratlösung

3,3 Diaminobenzidin tetrahydrochlorid	20 mg
Natriumazid	65 mg
30 %-iges H ₂ O ₂	10 µl
0.05 M Tris-HCl Puffer pH 7.6	100 ml
Vor Gebrauch 30 %-iges H ₂ O ₂ zugeben (0.1 ml)	

Cobalt-DAB

3,3 Diaminobenzidin tetrahydrochlorid	50 mg
0.05 M Tris-HCl Puffer pH 7.6	100 ml
1 % CoCl ₂	1 ml
3 %-iges H ₂ O ₂	0.1 ml
Vor Gebrauch 0.1 ml 3%-iges H ₂ O ₂ zugeben.	

3 - Amino - 9 - Ethylcarboxole (AEC)

0.05 Tris - HCl Puffer pH 7.6	50 ml
Aqua dest	44 ml
30 %-iges H ₂ O ₂	20 µl
Stammlösung (0.166 g Carbazol in 100 ml Dimethylformamid -DMF-)	6 ml
Vor Gebrauch 30 %-iges H ₂ O ₂ zugeben.	

4 - Chloro - 1 - Naphthol

i) 4 - Chloro - 1 - Naphthol - Äthanol Lösung

80 %-ig Äthanol 100 ml

4-Chloro-1-Naphthol 0.2 g

ii) 0.1 M Phosphatpuffer (PB) (pH 7.4)

iii) 3 %-iges H_2O_2

i) 20 ml + ii) 80 ml + iii) 0.2 ml vor Gebrauch mischen.

Veronal acetat-gepufferte 1 %ige Methylgrün-Lösung pH 4.0

$CH_3COO Na \cdot 3H_2O$ 1.09 g

Barbital-Natrium 1.65 g

Aqua dest 280 ml

0.1 HCl 120 ml

Methylgrün 4 g

Vor Gebrauch filtrieren.

III A 2 b. Methoden

Die Versuchsfische wurden täglich beobachtet. Ein Fisch von jeder Gruppe wurde nach der Injektion jeweils nach Zeitplan getötet.

III A 3.

Zeitplan: An folgenden Tagen post infectionem: 1,4,8,15,22,29,39,48, 56,68,74,83,90 wurden die Fische der Gruppe 1 - 4 getötet. An den Tagen 13,19,28,35,71,71,334,343 wurden die Fische der Gruppe 5 getötet. Am 31. und 37. Tag p.i. starben je ein Fisch. Ferner wurden Fische, die deutliche Krankheitsanzeichen aufwiesen, getötet. Die Fische wurden mit MS222® (Tricain Methan Sulfonat) in 0.007 %iger Lösung narkotisiert und das Blut mit sterilen Einmalspritzen und sterilen Einmalkanülen (0.8 x 38 mm) aus der Schwanzvene entnommen. Anschließend wurden die Fische obduziert.

III A 4. Versuchsanordnung

Die Versuchsfische wurden in 5 Gruppen zu je 10 Exemplaren eingeteilt:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Applikationsart	i.p.	i.p.	i.m.	intracardial	intracardial
Injektionsmenge	0.1 ml PBS	$3.0 \times 10^8 / 0.1$ ml Bakterienlösung je 0.2 ml	$3.0 \times 10^8 / 0.1$ ml Bakterienlösung je 0.2 ml	$3.0 \times 10^8 / 0.1$ ml Bakterienlösung je 0.2 ml	$8.0 \times 10^8 / 0.1$ ml Bakterienlösung je 0.2 ml
Anzahl der Fische	10	10	10	10	10

III a 5. Lichtmikroskopie

Nach der Organentnahme (Herz, Leber, Niere, Kopfniere, Milz, Pankreas, Magen, Darm, Kiemen, Pseudobranchie, Auge, Gehirn und Muskel) wurden diese in 10 %iger Puffer-Formalinlösung oder Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraplast[®] eingebettet. An 3 μ m dicken Schnitten wurden folgende Färbungen und Reaktionen durchgeführt:

Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung, PAS-Reaktion, Masson-Trichrom-Eindegewebsfärbung, Phosphorwolframsäure - Hämatoxylin-Färbung (PTAH), Giemsa-Färbung, modifizierte Gram-Färbung nach MAC CALLUM - GOODPASTURE und nach BROWN und BRENN. Kongorot-Färbung, saure Phosphatase-Reaktion. Für Ausstrichpräparate des Ascites wurde die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (pH 6.4) verwendet. Die Präparate wurden luftgetrocknet, fixiert und gefärbt.

Die Präparate wurden mit einem SM-Lux Mikroskop (Leitz) ausgewertet. Photographien konnten mit einem Photomikroskop G 41-170 (Zeiss) angefertigt werden.

III a 6. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden sofort nach der Tötung mit entfetteten Rasierklingen Teile vom Herzen in 4 %ige Glutaraldehydlösung verbracht. Die Dauer der Fixation betrug 3-4 Stunden, dann erfolgte mehrmalige Spülung in einer Saccharose-Puffer-Lösung nach SÖRENSEN bei 4 °C. Anschließend wurden die Gewebstücke 2 Stunden lang in einer 2 %igen Osmiumtetroxid-Lösung (OsO_4) nach CAULFIELD nachfixiert, dann nach mehrmaligem Spülen mit Saccharose-Puffer-Lösung nach SÖRENSEN in einer aufsteigenden Acetonreihe dehydriert und in vorgetrocknete Gelatine kapseln gelegt. Darin wurden sie nach der Methode von LUFT (1961) mit Epon 812 (aliphatisches Epoxid-Harz) eingebettet und ca. 4 Tage lang im Brutschrank bei 60°C getrocknet. Nach erfolgter Auspolymerisation des Epons konnte die Gelatine kapsel mit Wasser entfernt werden. Die Blöckchen wurden mit einer Trimmvorrichtung TH60 (REICHERT) vorbereitet. Semidünnschnitte wurden auf einem Porter Blum MT-1-Ultra-Mikrotom (AORVELL, Inc.) angefertigt und mit Toluidinblaulösung ange-färbt. Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut[®] (Reichert-Jung) angefertigt und nach REYNOLDS mit Uranylazetat 30 Min. und mit Bleizitrat 10 Min. kontrastiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Elektronenmikroskop EM109 (Zeiss).

III. A 7. Immunhistologie

Für die Immunhistologie wurden entparaffinierte histologische Schnitte, fixierte Gefrierschnitte und Kryostatschnitte vorbereitet.

Teile von fixierten und unfixierten Organen wurden in mit flüssigem Stickstoff (-193°C) gekühltes 2-Methylbutan getaucht. Davon wurden Kryostatschnitte mit Schnittdicken zwischen 3-6 μm angefertigt.

Die unfixierten Schnitte wurden mit -20°C kaltem Aceton 10 Minuten fixiert.

Die Schnitte wurden durch dreimaliges Spülen in PBS (je 5 Min.) gewaschen. Übermäßig viel Flüssigkeit wurde abgetupft. Der Objektträger wurde mit ca. 100 μl 1-5 %igem Schweinenormalserum 10 Min. inkubiert. Überschüssiges Serum wurde vorsichtig abgetupft. Der Objektträger wurde dann mit ca. 100 μl von 1:200 - 1:1000 verdünntem Anti-BKD-Kaninchenserum für 60 Min. bzw. über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Objektträger mit gleich konzentriertem Kaninchennormalserum ebenso inkubiert. Danach wurde mit PBS dreimal je 5 Min. gespült. Der Objektträger wurde mit ca. 100 μl 1:60 - 1:180 verdünntem Peroxidase markiertem Schwein-anti-Kaninchenserum (DAKO) 60 Min. bzw. über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS dreimal je 5 Min. gespült. Die Schnitte wurden mit folgenden Substanzen gefärbt und eingedeckt, Zellkernfärbungen durchgeführt und danach mit Einschlussmitteln eingebettet:

	I.	II.	III.	IV.
Substanzlösung	Diaminobenzidin (DAB)	Cobalt-DAB	Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	4-Chloro-1-naphthol
Zellkernfärbung	Methylgrün Hämatoxylin	Kernechtrot	Hämatoxylin	Kernechtrot
Einschlussmittel	Eukitt	Eukitt	Glyzerinpuffer Glyzerin- Gelatine	Glyzerinpuffer, Glyzerin-Gelatine

III A 7 a. DAB-Methode

Die nach der zweiten Inkubation mit PBS gut gewaschenen Schnitte wurden mit DAB H_2O_2 Reagenz 5 bis 10 Minuten inkubiert. Der Objektträger wurde dann mit Aqua dest 3 bis 5 mal gewaschen. Danach wurde eine Zellkernfärbung mit Methylgrün 20 Min. oder über Nacht durchgeführt. Dann wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser getaucht und in 95 %igem Alkohol 1 mal und 100 %igem Alkohol 3 mal entwässert und in Xylol verbracht. Die gefärbten Schnitte wurden mit Eukitt eingeschlossen.

III A 7 b. DAB-Cobalt-Methode

Zuerst wurden die mit PBS gut gewaschenen Schnitte in 0.05 M Tris-HCl Puffer (pH 7.6) mit 50 mg DAB 4 HCl in 100 ml Aqua dest. getaucht. Dazu wurde langsam 0.5 %iges $CoCl_2$ zugegossen. Damit wurden die Schnitte 5 Minuten lang preinkubiert. 10 μ l 30 %iges H_2O_2 wurde dazu gegeben und 2-3 Minuten inkubiert. Der Objektträger wurde mit Aqua dest 3 - 5 mal gewaschen. Danach wurde mit Kernechtrot 5-10 Minuten gefärbt. Die Schnitte wurden mit Aqua dest. gut gewaschen, mit Alkohol entwässert, in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckt.

III A 7 c. AEC-Methode

Die mit PBS gut gewaschenen Schnitte wurden mit AEC- H_2O_2 -Reagenz 40 Minuten inkubiert. Der Objektträger wurde mit Aqua dest 3-5 mal gewaschen. Danach wurde mit Hämatoxylin 3-5 Minuten gefärbt, mit Aqua dest gebläut und mit Glyzerin-Gelatine eingeschlossen.

III A 7 d. Chloro-Naphthol-Methode

Die mit PBS gut gewaschenen Schnitte wurden mit Chloro-Naphthol- H_2O_2 -Reagenz 30 Minuten inkubiert. Die Objektträger wurden mit Aqua dest 3 bis 5 mal gewaschen. Danach wurde mit Kernechtrot 5 bis 10 Minuten gefärbt. Die Schnitte wurden mit Aqua dest gut gewaschen und mit Glyzerin-Gelatine eingeschlossen.

III A 8. Bakteriologie

Zur Anzucht wurde das Selektivmedium "SKDM" (AUSTIN et al., 1983) verwendet. Zur Anzucht des Erregers aus steril entnommenen Organproben wurden diese nach thermischer Oberflächendesinfektion in einem entsprechenden Volumen (5 ml/g Gewebe) sterilen Peptonwassers homogenisiert und zentrifugiert (9000 rpm/5 Min.). Der Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Gewebshomogenat wurde in kaltem, sterilen Peptonwasser (1 ml/g Gewebe) resuspendiert und in sterilem, kaltem PBS von 10^{-1} bis 10^{-4} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde je ein Tropfen (etwa 100-200 μ l) auf den SKDM - Agar aufgetropft. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 16 - 18°C im Kühlbrutschrank. Die angezüchteten Bakterien wurden nach einer Bebrütungsdauer von 6 - 21 Tagen im Nativ- und Gram-Präparat beurteilt, außerdem auf biochemische Reaktionen sowie fluoreszenzserologisch untersucht.

III A 9. Indirekte Immunofluoreszenz (IFAT)

Auf den Testfeldern wurde ein Abklatsch von angezüchteten Bakterienkulturen mit einigen Tropfen eines spezifischen Kaninchenantiseraums (Verdünnung 1:80, eigene Herstellung, s. SCHAUNER, 1986) überschichtet und 30 Min. lang bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Das nicht gebundene Serum wurde durch dreimaliges Spülen in PBS (je 5 Min.) entfernt.

Das Präparat wurde dann mit FITC - konjugiertem Antikaninchenserum (Fa. Cappel), Verdünnung 1:200, bedeckt. Nach Inkubation u. Waschen wurde mit Glyzerinpuffer, pH 8.5, eingedeckt. Als Kontrolle diente ein Feld auf demselben Objektträger, auf dem das Kaninchennormalserum inkubiert wurde.

III A 10. IFAT bei Organabklatschpräparaten und entparaffinierten histologischen Schnitten

Die Schnitte wurden durch dreimaliges Spülen in PBS (je 5 Minuten) gewaschen. Der Objektträger wurde mit ca. 100 μ l (4-6 Tropfen) 1 - 5 %igem Schweinenormalserum für 10 Minuten inkubiert. Überschüssiges Serum wurde vorsichtig abgetupft. Der Objektträger wurde mit

ca. 100 μ l von 1:200 - 1:1000 verdünntem Anti-BKD-Kaninchenserum für 60 Minuten bzw. über Nacht inkubiert. Das Kontrollpräparat wurde mit ca. 100 μ l von 1:200 - 1:1000 verdünntem Kaninchennormalserum 60 Min. oder über Nacht inkubiert. Der Objektträger wurde mit PBS dreimal je 5 Min. gespült. Der Objektträger wurde mit ca. 100 μ l 1:200 FITC - verdünntem, konjugiertem Anti-Kaninchen-Serum 60 Min. inkubiert. Die Schnitte wurden durch dreimaliges Spülen in PBS (je 5 Min.) gewaschen. Die Präparate wurden mit Glyzerinpuffer, pH 7.2 oder Glyzerin-Gelatine (1:9) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop Dialux 20 (Leitz) mit Fluoreszenzeinrichtung (Fluoreszenzauflichtilluminator Plöemopak 2.4 (Leitz)). Das UV-Licht im Bereich von 380 nm wurde von einer Quecksilberhochdrucklampe (Leitz HB - Lampe 50 w/ac) erzeugt. Es wurden ein Wärmeschutz-, ein Erreger- (Leitz BG 12) und ein Sperrfilter (K 510) verwendet.

III B. Ergebnisse

III B 1. Klinischer Verlauf und Symptomatik (Tabelle 1-4)

Die Kontrollfische wiesen keine pathologischen Veränderungen auf.

Die infizierten Fische (von Gruppe 2 bis Gruppe 5) zeigten schon nach zwei bis drei Tagen Appetitabnahme und Mattigkeit. Die Fische der Gruppe 5 sonderten sich voneinander ab. Petechiale Blutungen am Abdomen und an den Flossenbasen wurden sichtbar. Das Abdomen schwell an. Außerdem wurde ein beidseitiger Exophthalmus und eine Trübung der Linsen festgestellt. Am 31. und 37. Tag p.i. sind Todesfälle aufgetreten. Am 71. Tag zeigte ein Fisch neurologische Symptome. Der Fisch wies vom 64. Tag p.i. bis zum Tod am 71. Tag p.i. Drehbewegungen auf. Ebenfalls am 71. Tag trat bei einem Fisch ein großflächiges tiefes Geschwür im Bereich der Rückenflosse auf. (Abb. 1).

III B 2. Pathologisch - anatomische Befunde (Tabelle 4)

Gruppe 1, 2 und 4 waren ohne besonderen Befund. Fische der Gruppe 3, welche intramuskulär infiziert wurden, wiesen in der zweiten Woche p.i. petechiale Blutungen in der Muskulatur nahe der Injektionsstelle auf. In der Gruppe 5 wurde bei allen Fischen Exophthalmus, Blutungen am Abdomen, Blutungen an der Innenseite des Kiemendeckels, petechiale Blutungen in der Thymusgegend, Ascites, safranfarbene Leber, anämische und brüchige Niere, anämische Kiemen, speckige geschwollene Milz, petechiale Blutungen in der Bauchwand und fibrinös-eitrige Beläge am Herzen festgestellt. Der Enddarm war geschwollen und der Darminhalt war weißlich bis gelblich und von schleimiger Konsistenz.

Tab.1 Symptomatik und Bakteriologie der i.p. infizierten Fische
(Gruppe 2) (n = 13)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
gestorben													
getötet, moribund													
getötet, unauffällig	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<u>Verhaltensänderungen</u>													
Appetitabnahme		x	x										
Dunkelfärbung													
Mattigkeit		x	x										
Drehbewegungen													
Absonderung vom Schwarm													
<u>Bakteriologie</u>													
Anzucht	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IFAT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tab.2 Symptomatik und Bakteriologie der i.m. infizierten Fische
(Gruppe 3) (n = 13)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
gestorben													
getötet, moribund													
getötet, unauffällig	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<u>Verhaltensänderungen</u>													
Appetitabnahme		x	x										
Dunkelfärbung													
Mattigkeit		x	x										
Drehbewegungen													
Absonderung vom Schwarm													
<u>Bakteriologie</u>													
Anzucht	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
IFAT	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Tab.4 Symptomatik und Bakteriologie der intracardial (hohe Dosis) infizierten Fische (Gruppe 5) (n = 10)

[illegible]

III B 3. Lichtmikroskopische Befunde am Herzen

Gruppe 1: Gruppi 1 (Kontrollfische) waren ohne besonderen Befund.

Gruppe 2 (i.p. infizierte Fische, s. Tabelle 5)

1. Tag: Keine Veränderungen

4. Tag: Die in den äußeren Schichten des Myokards liegenden Myozyten waren stark vakuolisiert (Abb. 2). Im umliegenden Gewebe der nekrotischen Muskelfasern wurden außerdem entzündliche Infiltrate (zumeist Granulozyten) angetroffen.

8., 15. und 22. Tag: Keine Veränderungen

29. Tag: Im Myokard waren viele Lymphozyten diffus zwischen den Muskelfasern zu erkennen.

39. Tag: Viele Lymphozyten wurden zwischen den Muskelfasern verteilt festgestellt. Zum Teil befanden sich Granulozyten und Lymphozyten im Subepikardialraum.

48. Tag: Mono-lymphozytäre Infiltrate wurden im Myokard festgestellt. Außerdem traten fokale Nekrosen im Myokard auf, die von entzündlichen Infiltraten, vorwiegend Lymphozyten und Makrophagen umsäumt wurden.

56. und 68. Tag: Keine Veränderungen

74. Tag: Lymphozytäre Infiltrationen wurden an den Muskelfasern festgestellt. Im Atrium konnten folgende Veränderungen beobachtet werden: Fehlen der Querstreifung und starke Eosinophilie bei Homogenisierung des Zytoplasmas.

93. Tag: Am Myokard konnten folgende Veränderungen festgestellt werden: Fehlen der Querstreifung und Karyolyse. Die nekrotischen Muskelfasern wurden von Makrophagen infiltriert und phagozytiert. An den Muskelfasern des Atriums waren eine stärkere Eosinophilie bei Homogenisierung des Zytoplasmas, Zellinfiltrationen (zumeist Granulozyten und Lymphozyten) und eine Vakuolenbildung zu erkennen.

91. Tag: Eine stärkere Eosinophilie bei Homogenisierung des Zytoplasmas wurde in den Muskelfasern festgestellt.

97. Tag: Keine Veränderungen.

Gruppe 3 (i.m. infizierte Fische, s. Tabelle 6)

1. Tag: Eine Nekrose wurde in den Muskelfasern subepikardial festgestellt. Außerdem wurden im umliegenden Gewebe der Nekrose vorwiegend granulozytäre Infiltrate und eine Infiltration mit Makrophagen

beobachtet. Eine Vakuolenbildung reichte über die gesamte Muskelfaser; die Muskelfasern waren teilweise schollig-zerfallen.

Eine entzündliche Infiltration und ein Granulom mit Lymphozytensaum wurden im Myokard am Übergang zum Endokard festgestellt.

Durch eine Proliferation der Kollagenfasern war der Subepikardialraum leicht verdickt. Jedoch konnten lymphozytäre Zellinfiltrationen dort nur in geringem Maße festgestellt werden.

4. Tag: Durch die Proliferation der Kollagenfasern hatte der Subepikardialraum an Dicke zugenommen.

8. Tag: Die leichte Vakuolenbildung reichte bis zu den Muskelfasern des Atriums. Eine geringgradige lymphozytäre Subepikarditis wurde am Apex cordis und am Atrium beobachtet.

15. Tag: Keine Veränderungen

22. Tag: Eine Granulombildung, zumeist Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen, war im Myokard zu finden. (Abb. 3) Im gesamten Myokard hatte eine Vakuolisierung der Myozyten stattgefunden, und die perinukleären Räume waren z.T. erweitert. Eine Pyknose, Degeneration des Zellkernes und Riesenzellen wurden im nekrotischen Bezirk beobachtet. Am Perikard des Bulbus arteriosus wurden geringgradige Zellinfiltrationen, zumeist Granulozyten, festgestellt. Im Atrium trat eine Zurückbildung des Myofibrillen auf, die Querstreifung fehlte und der Zellkern war geschwollen.

29. Tag: Im Myokard wurden Zellinfiltrationen zwischen den Muskelfaserbündeln (zumeist Makrophagen) festgestellt. Zum Teil konnte eine leichte Schwellung des Zellkerns beobachtet werden und die perinukleären Räume waren vereinzelt erweitert.

39. Tag: Eine leicht Zellinfiltration (zumeist Lymphozyten) zwischen den Muskelfasern im Atrium und im Ventrikel war zu erkennen.

48. Tag: In das Epikard und Myokard waren vereinzelt Entzündungszellen (zumeist Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten) eingewandert.

56. Tag: Keine Veränderungen

68. Tag: Eine Vakuolenbildung reichte über die gesamten Muskelfasern. Die perinukleären Räume waren zum Teil erweitert.

74. Tag: Eine Vakuolenbildung und das Fehlen der Querstreifung wurde in den Muskelzellen beobachtet. Makrophagen und Histiozyten waren vermehrt.

83. Tag: Viele histio-lymphozytäre Zellen waren als Zeichen einer beginnenden herdförmigen Myokarditis zwischen den Myozyten des Atriums zu finden (Abb. 4). Zum Teil wurden Zellinfiltrationen (zumeist Lymphozyten) im Subepikardialraum festgestellt.

91. Tag: Eine stärkere Eosinophilie bei Homogenisierung des Zytoplasmas wurde in den Muskelfasern angetroffen.

97. Tag: Eine Vakuolenbildung reichte über die gesamten Muskelfasern. Das Epikard des Bulbus arteriosus war leicht verdickt.

Gruppe 4 (intracardial mit niedriger Dosis infizierte Fische)
Tabelle 7

1. Tag: Keine Veränderungen

4. Tag: Die gesamten Muskelfasern im Myokard waren vakuolisiert.

8. und 15. Tag: Keine Veränderungen

22. Tag: Hyperämie und Zelleninfiltration waren im Myokard feststellbar. Eine Vakuolenbildung reichte über mehrere Myozyten. Die nekrotischen Bezirke wurden von Granulozyten umsäumt. Im Bulbus wurde eine Schwellung der Fibrozytenzellkerne beobachtet. Eine Vakuolenbildung hatte im Zytoplasma der veränderten Zellen stattgefunden. In den äußeren Bereichen des Bulbus wurde nur eine geringgradige Zellinfiltration (zumeist Lymphozyten und Monozyten) festgestellt.

29. Tag: Kleine nekrotische Herde mit Makrophagen und Epitheloidzellen wurden in einzelnen Muskelfasern festgestellt. Das Epikard war geringgradig verdickt. Vereinzelte Zellinfiltrate, zumeist Lymphozyten und Monozyten, wurden auch hier gefunden. Ein nekrotischer Fokus im Epikard des Atriums wurde beobachtet. Folgende Veränderungen konnten im Ventrikel festgestellt werden:

Eine Zurückbildung der Myofibrillen, das Fehlen der Querstreifung und eine Schwellung der Zellkerne.

39. Tag: Das Perikard war leicht verdickt. Zellinfiltrate (zumeist Makrophagen, Histiozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten) wurden im Atrium, im Bulbus und im Ventrikel gefunden.

48. Tag: Im Atrium und besonders im Bulbus wurden Bakterien und Entzündungszellen angetroffen, die sich zu knotenförmigen Gebilden sammengelagert hatten.

56. Tag: Keine Veränderungen.

74. Tag: In Muskelfasern fand eine Vakuolenbildung statt, die Querstreifung fehlte. Makrophagen infiltrierten diesen Bereich. Die Epithelzellen des Perikards am Apex cordis waren vermehrt.

83. Tag: Eine stärkere Eosinophilie wurde bei Homogenisierung des Zytoplasmas festgestellt, ebenso das Fehlen der Querstreifung im Atrium und im Ventrikel. Dieses Phänomen trat im Atrium deutlicher hervor als im Ventrikel. Lymphozytäre Infiltrate wurden im Perikard des Bulbus arteriosus festgestellt.

91. Tag: Keine Veränderungen.

97. Tag: Die Vakuolenbildung reichte über die gesamten Muskelfasern.

Gruppe 5 (intracardial mit hoher Dosis infizierte Fische
Tab. 6)

13. Tag: Bakterien fanden sich zwischen Myozyten im Atrium und im Ventrikel. Dabei entstanden diffuse Herde mit degenerierenden Myozyten. Die Muskelfibrillen waren meist gebrochen. Zahlreiche Vakuolen wurden gebildet, eine Querstreifung der Muskelfasern fehlte. Subepikardial, insbesondere am Apex cordis, fielen herdförmige lymphozytäre Infiltrate auf. Die Zellkerne der Myozyten waren geschwollen und die Kerne pyknotisch. Zahlreiche Bakterien waren nachweisbar.

19. Tag: Fibrin sammelte sich zwischen Epikard und Perikard. Den inneren und äußeren Rand dieser Fibrinansammlung säumten Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Das Epikard war aufgrund der Entzündungsvorgänge enorm verdickt und der Subepikardialraum war kaum zu erkennen. Zum Teil wurden Bakterien, Entzündungszellen, nekrotische Zellen, eine beginnende Granulombildung und eine Proliferation der Kapillargefäße festgestellt (Abb. 5). Im Bulbus arteriosus und im Ventrikel waren die Grenzen zwischen der Entzündung und dem unveränderten Bereich fließend. Über die Kompakta des gesamten Myokards reichten entzündliche Infiltrate (zumeist Makrophagen und Fibroblasten) und Bakterienherde (Abb. 6). Die Spongiosa des Myokards veränderte sich nicht so stark. Dennoch konnte eine Vakuolenbildung im Zytoplasma einiger Herzmuskelzellen festgestellt werden, die teilweise auf die Muskelfibrillen übergriff. Zusätzlich trat auch eine Schwellung bzw. eine pyknotische Degeneration der Zellkerne auf. Insgesamt veränderte sich die Spongiosa der Ventrikel weniger, als die der Kompakta.

28. Tag: Das Epikard war stark verdickt. Entzündungszellinfiltrate (zumeist Monozyten, Makrophagen, Histiozyten) fanden sich auch im Myokard. Die Grenze zwischen Epikard und Myokard war nur schwer zu erkennen. In der gesamten Spongiosa konnten eine Vakuolenbildung und das Fehlen der Querstreifung festgestellt werden.

31. Tag: Das Subepikard des gestorbenen Fisches war nicht so stark verdickt, wie das des untersuchten Fisches der Gruppe 5 vom 28. Tag. Das Epikard war von Fibrin, Bakterien und Entzündungszellen umgeben. Zahlreiche Makrophagen enthielten massenhaft Bakterien, die sich besonders deutlich mit der HRP-Methode darstellten (Abb. 7). Das Myokard war weitgehend nekrotisch und atrophisch und enthielt zahlreiche Bakterienherde. Zwischen den Myozyten befanden sich Zellinfiltrate, überwiegend Makrophagen, die Bakterien und amorphes Material enthielten. Die Myozyten wurden dadurch auseinander gedrängt. Außerdem trat vereinzelt eine Vakuolisierung der Muskelfasern auf.

35. Tag: Außerhalb des Perikards erfolgte eine Fibrinzubildung. In diesem Fibringerüst sammelten sich viele Entzündungszellen (zumeist Makrophagen, Histiozyten und Epitheloidzellen). Das Epikard hatte an Umfang zugenommen. Sowohl Myokard als auch Subepikardialraum waren von diesen Entzündungszellen infiltriert, so daß die Grenze zwischen Epikard und Myokard schwer erkennbar war. In der Kompakta des Ventrikels konnten folgende Veränderungen festgestellt werden: Netzartige nekrotische Muskelfasern, Granulombildung, eine Zurückbildung der Myofibrillen, Fehlen der Querstreifung, Entzündungszellinfiltrate mit zumeist Epitheloidzellen, Makrophagen mit Bakterien, Lymphozyten und Granulozyten und leichte Hyperämie. Eine Vakuolisierung reichte über die gesamte Spongiosa. Die Veränderungen in der äußeren Schicht des Atriums glichen denen im Ventrikel. In der inneren spongiösen Schicht des Atriums reichte die Vakuolenbildung über einen größeren Bereich. Entzündungszellen infiltrierten zwischen den Muskelfasern.

37. Tag: Außerhalb und innerhalb des Perikards und im Subepikardialraum lagerten sich viele Bakterien an (Abb. 8). Dort infiltrierten Entzündungszellen, außerdem waren Herdnekrosen im Epikard festzustellen. Die Bakterien drangen bis zu der Kompakta des Ventrikels in die innere Schicht des Bulbus und des Atriums vor. Am Endokard und in der Spongiosa erfolgte eine starke Granulationsgewebsbildung. Zwischen den lockeren Balken des Bulbusgewebes und den intertrabekulären Freiräumen des Atriums und des Ventrikels ließen sich zahl-

reiche Emboli, die aus Bakterien und entzündlichen Infiltrationen zusammengesetzt waren, nachweisen. Zwischen den Muskelfasern fanden sich Entzündungszellen, degenerierende Zellen und Bakterien. Außerdem fehlte die Querstreifung der Myofibrillen.

71. Tag: Teilweise wurde Granulationsgewebe mit Blutungen, Bakterien und Zellinfiltrationen zwischen Perikard und Epikard des Ventrikels festgestellt. Das Perikard und das Epikard waren verdickt. Dieselben Veränderungen waren in geringem Maße im Atrium nachzuweisen. Die Koronargefäße waren stark mit Blut gefüllt. Am Übergang von Bulbus und Atrium war ein umfangreiches Granulationsgewebe feststellbar. Dieses Granulationsgewebe bestand zumeist aus Entzündungszellen, Bakterien und neuen Kapillargefäßen. Im Ventrikel war unmittelbar unterhalb der Atrioventrikularklappe ein rundliches, ins Lumen ragendes Granulom mit vorwiegend Epitheloidzellen, die z.T. Bakterien enthielten, zu finden (Abb. 10).

71. Tag: Das Epikard hatte um das Doppelte an Umfang zugenommen. Der Übergang zwischen Epikard und Myokard war nur mehr schwer zu erkennen. Im Myokard war eine Vakuolenbildung und fehlende Querstreifung festzustellen. Zwischen den Myozyten befand sich ein Granulom mit Blutungen. Daneben lagen eine Hyperämie und Blutungen im Subepikardialraum vor.

334. Tag: Eine ausgeprägte Perikarditis war festzustellen und in der Umgebung dieser Myozyten waren diese degeneriert. Das Epikard war leicht verdickt. Im Epikard fanden sich einige bakterielle Herde (Abb. 11).

343. Tag: Makrophagen und Granulombildungen waren im Subepikardialraum festzustellen. Das Epikard war wegen der Zellinfiltration und der Bakterien leicht verdickt. Teilweise war das Epikard ödematös. Im Myokard waren Granulome erkennbar.

Tab.5 Mikroskopische Befunde am Herzen von i.p. infizierten Fischen (Gruppe 2)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
Vakuolenbildung		x											
Nekrose		x						x				x	
Zellinfiltrationen		x				x	x	x			x		
Myokarditis						x	x	x					
Epikarditis						x	x						
sonstige Veränderungen der Herzmuskulatur												x	x

Tab.6 Mikroskopische Befunde am Herzen von i.m. infizierten Fischen (Gruppe 3)

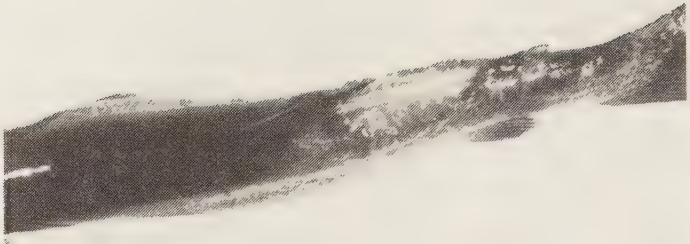
<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
Vakuolenbildung	x		x		x					x	x		x
Nekrose	x				x								
Zellinfiltrationen	x				x	x	x	x				x	
Phagozytosehäufigkeit	x				x								
Granulombildung					x								
Epikarditis	x	x	x					x				x	x
Myokarditis					x	x	x	x					
Verlust der Querstreifung					x					x	x		
Kernpyknose					x								

Tab.7 Mikroskopische Befunde am Herzen von intracardial infizierten Fischen (Gruppe 4)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	82	90
Anwesenheit von Bakterien								x					
Vakuolenbildung	x	x			x						x		x
Nekrose					x	x					x		
Zellinfiltrationen					x	x	x	x	x		x	x	
Phagozytosehäufigkeit											x		
Granulombildung					x			x					
Hyperämie					x								
Epikarditis						x	x		x		x		
Verlust der Querstreifung							x				x	x	
Zurückbildung der Myofibrillen						x							
Kernpyknose					x	x							

Tab.8 Mikroskopische Befunde am Herzen von intracardial infizierten Fischen (Gruppe 5)

<u>Tag post infectionem</u>	10 13	11 19	12 28	13 31	14 35	37	71	71	334	343
Bakterien im Muskel	x			x	x	x	x	x	x	x
Bakterien in Makro- phagen	x			x	x	x	x			
Vakuolenbildung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Nekrose	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Zellinfiltrationen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phagozytosehäufig- keit	x				x	x	x	x	x	x
Granulombildung		x	x		x		x	x	x	x
Profilferation der Kapillargefäße		x	x			x	x	x		
Hyperämie	x		x		x		x	x		
Blutungen	x						x	x	x	
Perikarditis		x	x	x	x		x		x	x
Epikarditis	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Myokarditis		x	x		x	x	x	x		x
Ansammlung von Fibrin		x			x					
Fehlen der Quer- streifung	x	x		x	x	x	x	x		
Zurückbildung der Myofibrillen	x	x		x	x	x	x	x		
Schwellung	x	x								
ker- pyknotische Degeneration	x	x		x			x			
Karyorhexis						x	x		x	



1

Abb. 1: Großflächiges tiefes Geschwür caudal der Rückenflosse bei einer intracardial mit hoher Dosis infizierten Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* R.) 71. Tag p. inf.

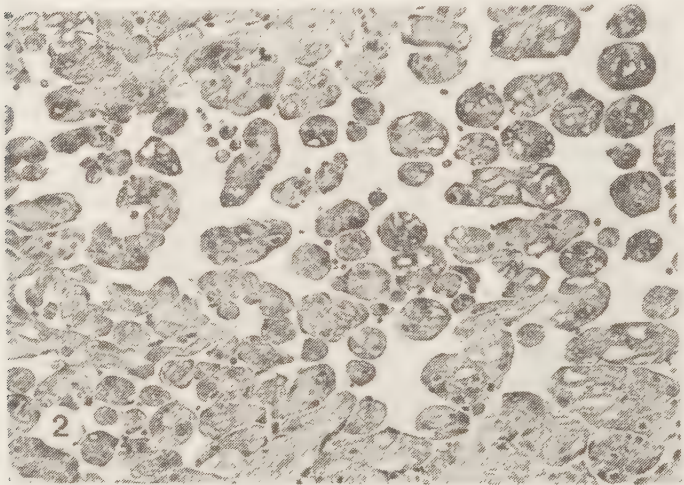


Abb. 2: Vakuolige Degeneration der Myozyten in der Sponiosa des Ventrikulum cordis; i.p. infizierte Regenbogenforelle; 4. Tag p. inf. PAS, Verg. 400 x

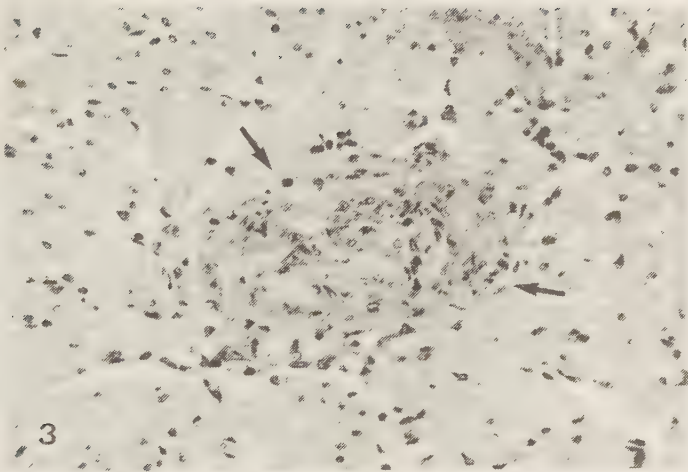


Abb. 3: Granulombildung mit Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen im Myokard des Ventrikulum cordis. i.p. infizierte Regenbogenforelle; 22. Tag p.inf. HE, Vergr. 400 x

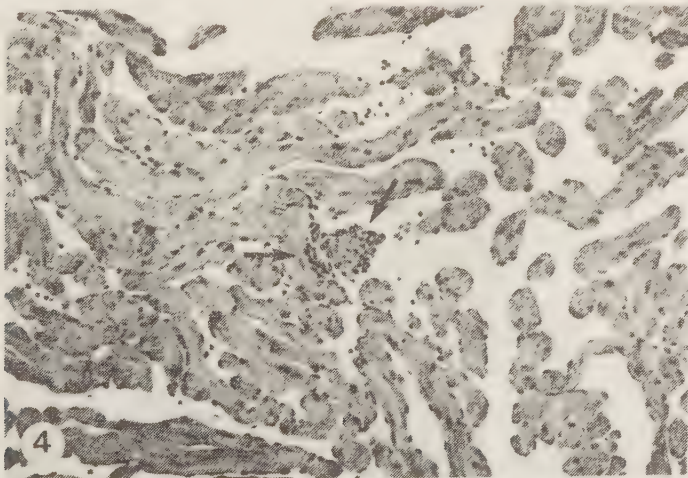


Abb. 4: Herdförmige Myokarditis mit histio-lymphozytären Infiltraten im Atrium cordis. I.m. infizierte Regenbogenforelle; 83. Tag p.inf. HE, Vergr. 400 x

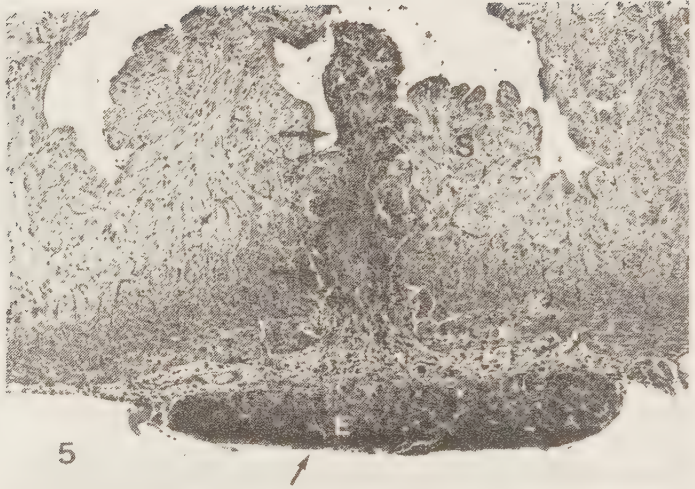


Abb. 5: Entzündungsvorgänge (↑) am Epikard (E) bis tief in die Kompakta (K) und Spongiosa (S) des Ventrikel-Myokards reichend. Intracardial mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle; 19. Tag p.inf. HE; Vergr. 40 x

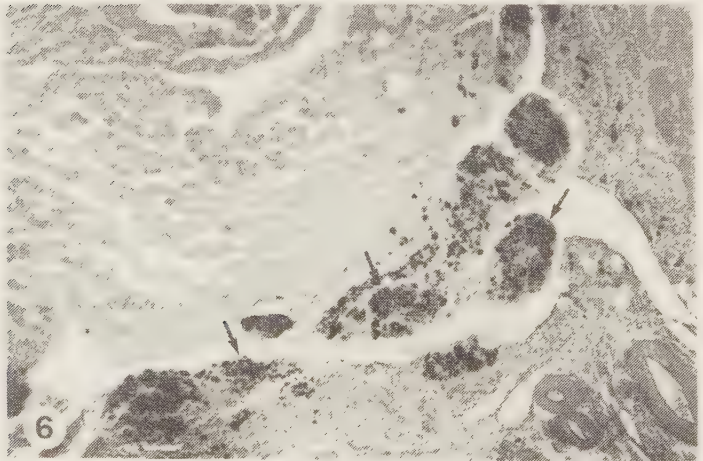


Abb. 6: Entzündliche Infiltrate mit Bakterien (↑) am Übergang zwischen Ventrikulum cordis und Bulbus arteriosus. I.c. mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle Immunperoxidase Färbung, Vergr. 90 x

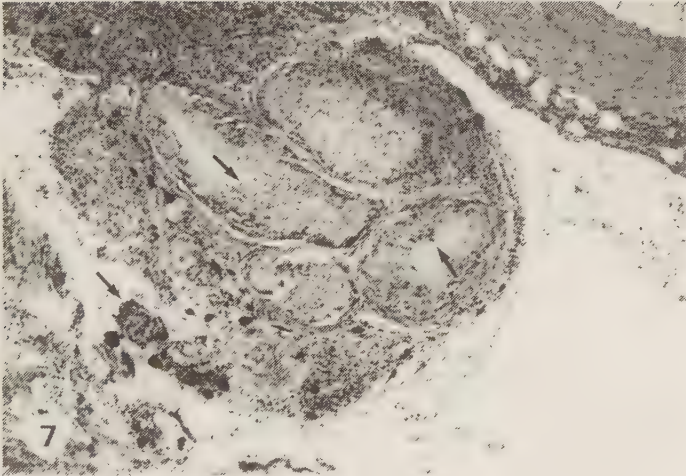


Abb. 7: Granulombildung am Epikard am Übergang von Ventrikulum cordis und Bulbus arteriosus. Deutlich sind peroxidase positive Zellen (↑) zu erkennen. I.c. mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle. 31. Tag p.inf. Immunperoxidase-Färbung mit Cobalt-DAB, Vergr. 120 x

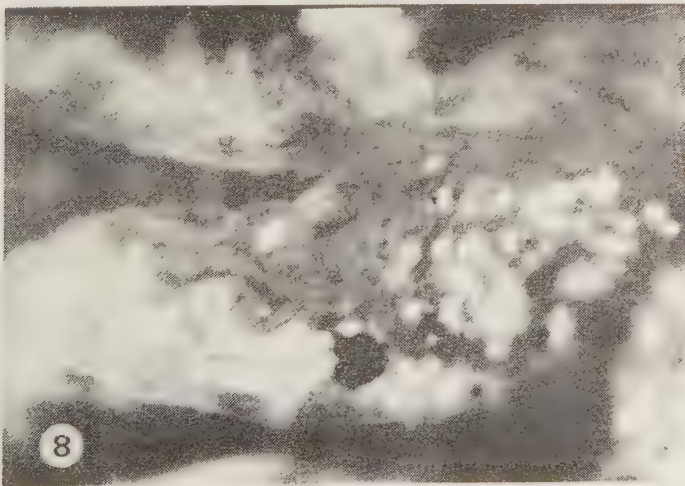


Abb. 8: Fluoreszenzserologische Darstellung. Bakterien in Makrophagen und außerhalb zeigen deutliche Fluoreszenz. I.c. mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle. 37. Tag p.inf., Verg. 250 x

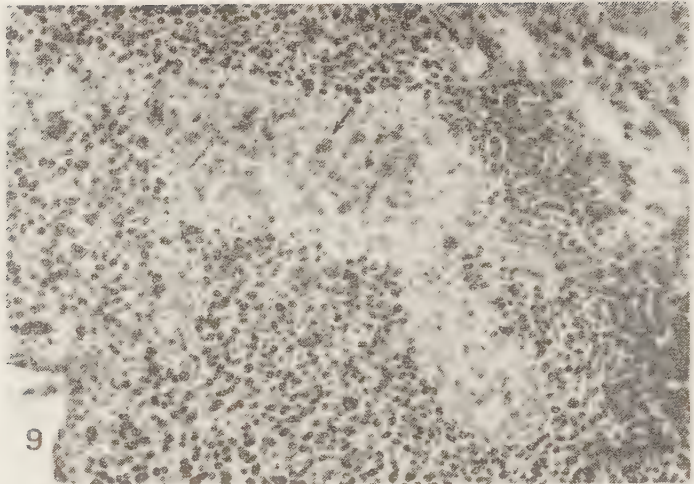


Abb. 9: Granulationsgewebe mit Blutungen, Bakterien und Zellinfiltration zwischen Perikard und Epikard des Ventrikels. Amino-9-Ethylcarbazol-positive Zellen (↑) stellen sich deutlich dar. Intracardial mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle; 71. Tag p.inf., Immunoperoxidase-Färbung mit AEC, Verg. 200 x

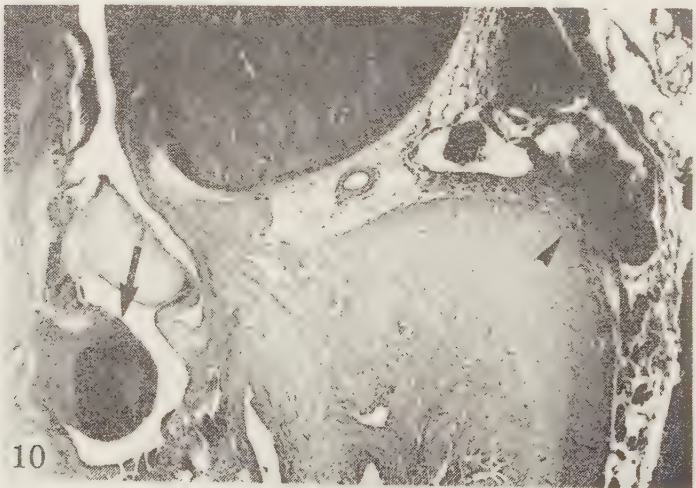


Abb. 10: Granulom der Atrioventrikularklappe (↑), Entzündliche Infiltrate mit Makrophagen und Fibrin im Subepikardialraum (▲). I.c. mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle; 71. Tag p.inf. PAS, Vergr. 40 x

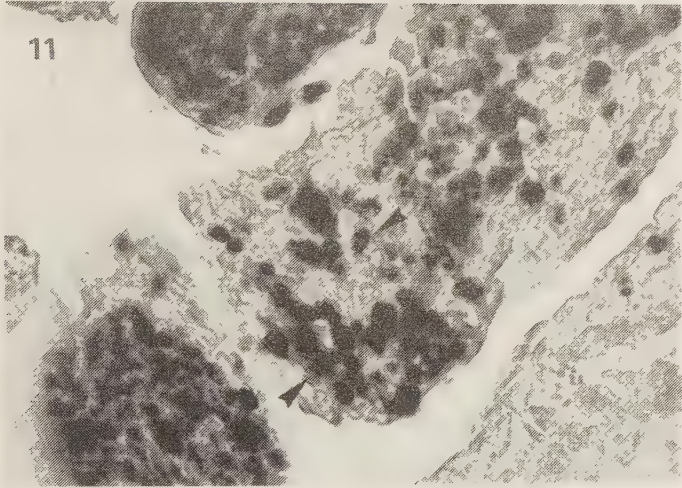


Abb. 11: Bakterienherd im Epikard des Ventrikels. Positive Zellen stellen sich deutliche bräunlich dar (▲). I.c. mit hoher Dosis infizierte Regenbogenforelle.
334. Tag p.inf. Immunperoxidase-Färbung, Vergr. 400 x

III B 4. Elektronenmikroskopische Befunde am Herzen

Bei den Fischen, die 35 Tage p.i. getötet wurden, konnten bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen folgende Veränderungen am Herzen festgestellt werden.

Atrium cordis

In den Bereichen, in denen lichtmikroskopische Veränderungen in der Struktur des Myokards festzustellen waren, zeigte sich elektronenmikroskopisch eine Disintegration des Zellverbandes. Sofern noch Muskelfasern vorhanden waren, war eine Bandenzeichnung derselben nicht mehr zu erkennen. Viele Myokardzellen wiesen in diesem Bereich ein auffallend elektronenlichtes Zytoplasma auf. Zeichen einer Degeneration wie Vakuolisierung des Zytoplasmas, Fehlen von Zellorganellen und Ablösung der Kernhülle waren erkennbar. In einem Großteil dieser degenerierten Zellen waren Bakterienansammlungen im Zytoplasma vorhanden (Abb. 12). Einzelne Bakterien schienen teilweise noch intakt zu sein, andere dagegen waren bereits im Abbau begriffen. Die intakten Bakterien stellten sich in einer Teilungsphase dar. Ihr charakteristischer äußerer Aufbau aus Zytoplasmamembran, 3-schichtiger Zellwand und äußerer Polysaccharidschicht war deutlich erkennbar. (Abb. 13) In der Nachbarschaft der Bakterien wurden vermehrt degenerierende Mitochondrien (Abb. 14) und lytische Bezirke im Zytoplasma beobachtet.

Ventriculum cordis

In zwischen den Myokardzellen befindlichen Makrophagen waren regelmäßig Bakterien bzw. Bakterienreste anzutreffen (Abb. 15). Aber auch in den Myozyten wurden Bakterien angetroffen. In einigen Bereichen der Kompakta erschienen die Myozyten geschwollen. Dabei befanden sich Bereiche mit vollkommen intakt scheinenden Muskelfasern, Mitochondrien und Glykogenansammlungen neben Bezirken mit lytischem Zytoplasma und stark dilatierten Schläuchen des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 16). Die Mitochondrien waren vergrößert und die Cristae mitochondriales größtenteils von der inneren Doppelmembran abgelöst. An den Myofilamenten des veränderten Bereiches fehlte eine Bandenstruktur vollkommen.

In der Umgebung dieser Myozyten waren Muskelzellen mit schnurartig aufgerollten, stark dilatierten Schläuchen von granulärem endoplasmatischem Retikulum zu sehen (Abb. 17).

Die Zellkontakte zwischen den Zellen waren gelöst und erweitert.

Bulbus arteriosus

Neben intakten kompakten Bündeln aus Fibrozyten fanden sich Bereiche in denen einzelne Fibrozyten vom Zellverband losgelöst waren (Abb. 18). Diese Zellen wiesen geschwollene Mitochondrien mit abgelösten Cristae mitochondriales auf. Außerdem war das endoplasmatische Retikulum stark delatiert (Abb. 19).

In einzelnen Fibrozyten befanden sich in der Nachbarschaft von Golgiapparaten zahlreiche Lysosomen, Phagolysosomen, Autolysosomen und "residual bodies". In den sekundären Lysosomen konnten noch Reste von phagozytierten Bakterien identifiziert werden (Abb. 20). Reste von Glykogenansammlungen waren erkennbar.

In der Umgebung der veränderten Gewebsbereiche wurden Zellen beobachtet, die Mastzellen glichen (Abb. 21). Der längliche Kern war stets randständig und die zahlreichen unterschiedlich großen Vesikel wiesen einen Inhalt von mäßig bis starker Elektronendichte auf. Außerdem war der Inhalt der Vesikel unterschiedlich strukturiert. In einigen dieser Zellen konnten mehrere Golgiapparate und granuläres endoplasmatisches Retikulum beobachtet werden.

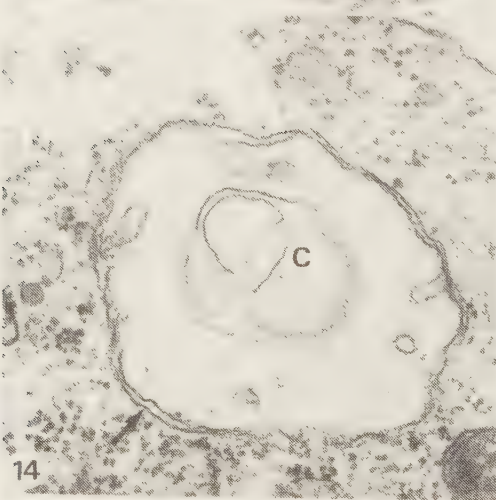
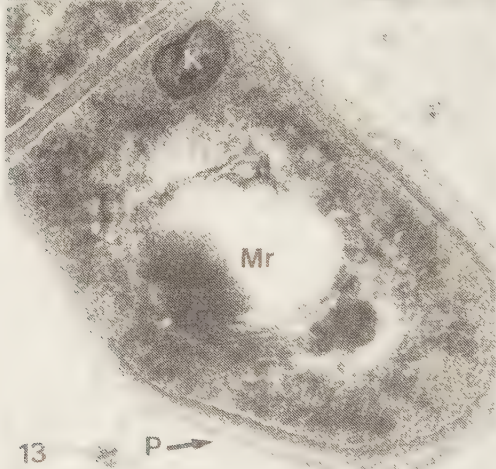
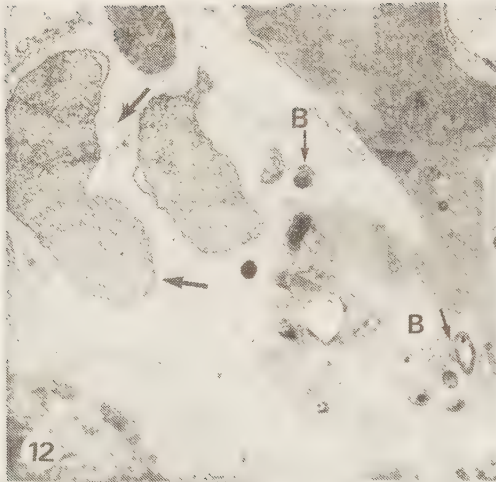


Abb. 12: Atrium cordis

Bakterienherde im Zytoplasma von Myozyten;
Bakterien (B) wurden z.T. bereits abgebaut.
Ablösung der Kernmembran
Vergr. 7900 x

Abb. 13: Atrium cordis

Ultrastruktur von Renibakterium salmoninarum.
Das Bakterium befindet sich in Teilung; der 3-
schichtige Aufbau der Zellwand ist deutlich zu
erkennen. Polysaccharidschicht (P); K=Kern-
äquivalent; M=Mesosomenrest Vergr. 148,000 x

Abb. 14: Atrium cordis

Degeneriertes Mitochondrium mit abgelösten und
aufgerollten Resten der Cristae mitochondriales (C).
Die Doppelmembran ist noch erkennbar (↑).
Vergr. 54,000 x

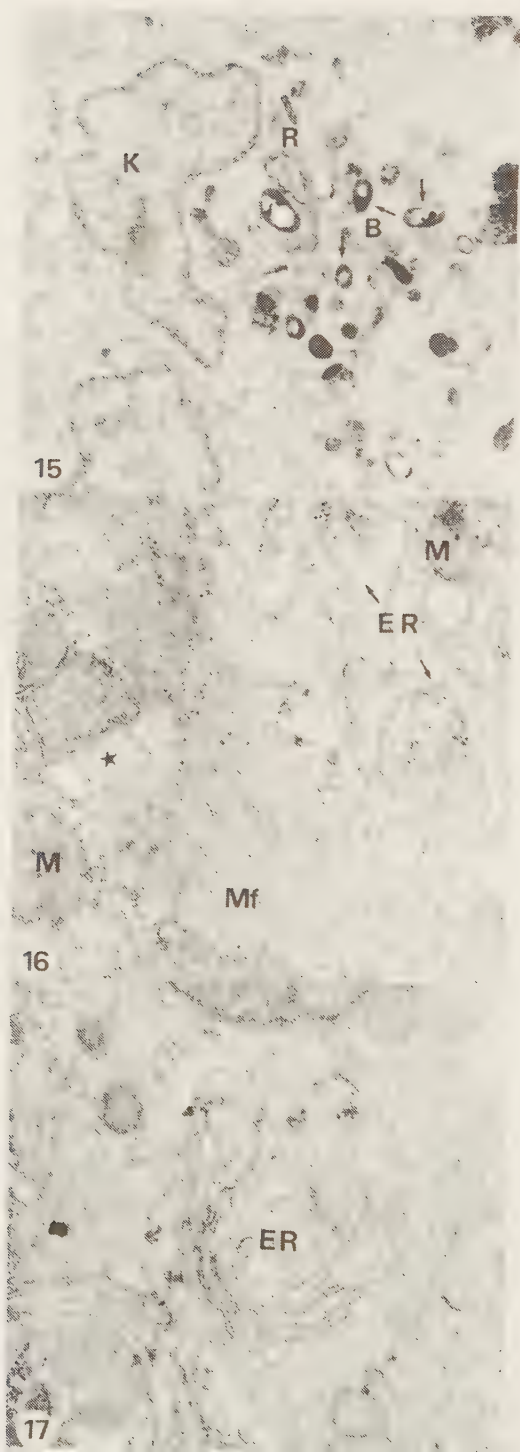


Abb. 15: Ventrikulum cordis

Makrophage im Myokard mit Bakterien (B) und
Bakterienresten (R) im Zytoplasma. Kern (K).
Vergr. 7900 x

Abb. 16: Ventrikulum cordis

Myozyt mit einem Bereich intakter Zellorganellen
neben einem Bereich mit degenerierendem geschwollenem
endoplasmatischem Retikulum (ER); Mitochondrium (M);
Myofilament (Mf) Vergr. 24,400 x

Abb. 17: Ventrikulum cordis

Degenerierender Myozyt mit aufgerolltem, dilatiertem
endoplasmatischem Retikulum (ER).
Vergr. 13,100 x



Abb. 18: Bulbus arteriosus

Intakter Bereich mit Fibrozyten im Bild unten ($\diamond$)
aufgelöstes Zellband mit Zellverband mit Zellresten
im Bild oben ($\blacklozenge$), Fibrozyt (F). Vergr. 3,600 x

Abb. 19: Bulbus arteriosus

Zellen aus dem aufgelösten Zellverband mit stark
dilatiertem endoplasmatischem Retikulum (ER);
vakuolisiertem Zytoplasma (V) und lysosomalen
Strukturen (L). Vergr. 4,700 x

Abb. 20: Bulbus arteriosus

Fibrozyten aus dem aufgelösten Zellverband.
Phagolysosomen, "residual bodies" und lysosomale
Strukturen mit Bakterienresten ($\uparrow$), Golgiappara-
te (G), Zellkern (K). Vergr. 7,900 x

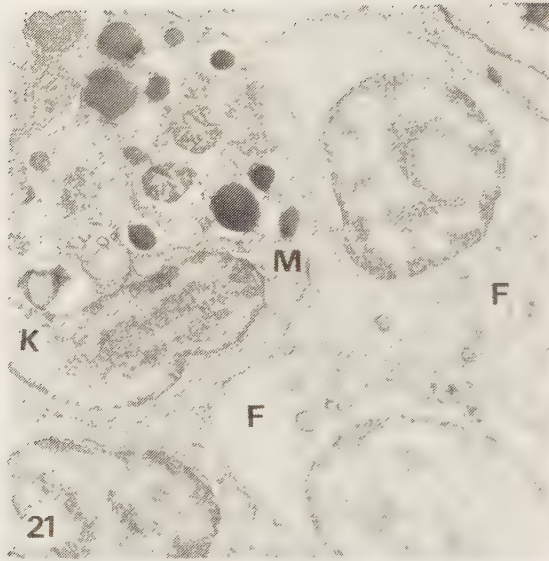


Abb. 21: Bulbus arteriosus

Mastzelle (M) mit zahlreichen unterschiedlich
großen und mit verschiedenen elektronendichten
Vesikeln im Fibrozytenverband (F), Zellkern (K).
Vergr. 7.900 x

III B 5 Mikroskopische Befunde an den übrigen Organen

Die Veränderungen in den übrigen Organen sind in allen Gruppen weitgehend vergleichbar und werden daher gemeinsam besprochen. Eine Übersicht über die Befunde geben die Tabellen 9 bis 12.

Veränderungen konnten in der Niere im Parenchym, Zwischengewebe und im serösen Überzug gefunden werden. Im exkretorischen Teil der Niere steht eine Glomerulonephritis im Vordergrund. Bei leichtem Krankheitsverlauf war eine vakuolige Degeneration der Tubuli festzustellen. Bei schwer erkrankten Fischen waren folgende Veränderungen am Glomerulum zu erkennen:

Hypertrophie der Basalmembran, Verdickung der Mesangiummatrix, Erweiterung der Kapillargefäße des Glomerulums, sowie eosinophile amorphe Ablagerungen in der Bowman'schen Kapsel, Ausweitung des Bowman'schen Raumes, Atrophie des Glomerulums, periglomeruläre Fibrosen, Degeneration und Nekrose des Glomerulums und entzündliche Infiltrate in der Bowman'schen Kapsel. Teilweise konnten Bakterienemboli im Glomerulum beobachtet werden. Im Interstitium waren neben einer Aktivierung des RES, Blutungen, Degeneration und Nekrose des hämatopoetischen Gewebes auch Bakterienansammlungen zu erkennen. Unter dem serösen Überzug der Niere fanden sich Blutungen und entzündliche Infiltrate.

Bei der Kopfniere ließ sich eine Aktivierung des RES feststellen. Vereinzelt trat eine starke Infiltration mit plasmazellartigen Zellen auf. Bei i.p. infizierten Fischen war eine vakuolige Degeneration der Interrenalzellen zu erkennen.

Bei Fischen, die intracardial mit hohen Dosen infiziert waren, konnten folgende Veränderungen in der Niere festgestellt werden: Blutungen, Degeneration, Nekrosen und bakterielle Foki im Interstitium, sowie Ödeme in Gefäßwänden von Arteriolen und Venulen, perivaskuläre Ödeme mit Infiltration von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Bakterien.

Bei der Milz was das RES aktiviert. Bei intracardial mit hoher Dosis infizierten Fischen wurde eine Degeneration und Nekrose der roten Pulpa und Bakterienherde z.T. mit Makrophagen festgestellt.

Die Leber ließ eine lymphatische Infiltration im Parenchym erkennen. Außerdem lagen herdförmige Degenerationen und Nekrosen im Parenchym vor, oft verbunden mit einer Aktivierung des RES. Bei mit hoher Dosis intracardial infizierten Fischen wurden überdies folgende Veränderungen in der Leber festgestellt:

Zentrolobuläre Blutungen, vakuolige Degeneration und Nekrose von Hepatozyten, Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen und Erweiterung des Disse'schen Raums. Eine Degeneration v.a. kleinerer Arterien (Vakuolisierung und Hyalinose der Tunica adventitia, Tunica media und Tunica interna), außerdem traten Ödeme und perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate hauptsächlich bei Arteriolen und teilweise bei Veniolen und in der Lebertrias auf.

Veränderungen am Auge waren nur bei Fischen, die intracardial mit hohen Dosen infiziert waren, feststellbar. Im retrobulbären Gewebe konnten folgende Veränderungen beobachtet werden:

Ödeme zwischen den Muskelfasern, gehäuft traten Makrophagen um nekrotische Muskelfasern und entzündliche Infiltrate zwischen den Muskelfasern und im Fettgewebe auf.

Bei der Skelettmuskulatur der Bauchwand intracardial infizierter Fische konnten folgende Veränderungen festgestellt werden:

Ödeme der Muskulatur, Hyalinose und Verlust der Querstreifung, Nekrose, Myolyse und Atrophie der Muskelfaser. Bei den nekrotischen Muskelfasern waren vermehrt Makrophagen und Entzündungszellinfiltrate zu beobachten.

Die Sekundärlamellen der Kiemen wiesen eine herdförmige Hypertrophie des respiratorischen Epithels und Verklebungen mit Hyperplasie der Schleimzellen auf (Gruppe 4 und 5).

Ein Fisch der Drehbewegungen zeigte, wies eine ausgeprägte Meningitis auf.

Tab. 9 Mikroskopische Befunde an den Organen i.p. infizierter
Fische (Gruppe 2)

<u>Tag post infectionem</u>	7	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
Erweiterung d. Kapillargefäße des Glomerulums		x							x		x		
Degeneration und Nekrose d. Glomerulums		x			x	x							
Atrophie des Glomerulums		x							x				
Eosinophile Ablagerungen in der Bowman'schen Kapsel				x					x				
Hypertrophie der Bowman'schen Kapsel		x			x	x			x		x		
Hypertrophie der Basalmembran		x			x	x		x			x		
Vermehrung des Mesangiumstromas		x				x			x		x		
Blutung i. Interstitium		x			x		x						
Degeneration und Nekrose des Interstitiums					x		x						
Vakuolige Degeneration der Harnkanälchen							x	x					
Aktivierung des RES								x	x				
Vakuolige Degeneration der Interrenalzellen								x					
Kopfnieren:													
Aktivierung des RES							x		x				
Leber:													
Entzündliche Infiltrate von Leukozyten								x					
Milz:													
Aktivierung des RES		x			x	x					x		

Tab. 10 Mikroskopische Befunde an den Organen i.m. infizierter
Fische (Gruppe 3)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
Niere:													
Erweiterung der Kapillargefäße des Glomerulums		x	x			x		x	x				
Hypertrophie der Basalmembran		x	x			x		x	x				
Vermehrung des Mesangiumstromas		x	x			x		x	x				
Degeneration und Nekrose d. Glomerulums			x			x		x					
Atrophie des Glomerulums			x			x		x					
Fibrose d. Glomerulums								x					
Entzündungszellen in der Bowman'schen Kapsel										x			
Hypertrophie der Bowman'schen Kapsel		x	x			x		x	x				
Vakuolige Degeneration und/oder peritubuläre Fibrose der Harnkanälchen						x	x	x				x	
Fibrose und Organisation der Harnkanälchen													x
Blutung im Interstitium						x							
Degeneration und Nekrose d. Interstitiums						x							
Aktivierung des RES			x						x				
Milz													
Aktivierung des RES			x				x	x					
Leber													
Degeneration der Hepatozyten										x			

Tab. 11 Mikroskopische Befunde an den Organen i.m. infizierter Fische (Gruppe 3)

<u>Tag post infectionem</u>	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
Niere:													
Erweiterung der Kapillargefäße des Glomerulums						x	x	x	x		x		
Degeneration und Nekrose d. Glomerulums									x				
Hypertrophie der Bowman'schen Kapsel						x	x	x	x		x		
Hypertrophie der Basalmembran						x	x	x	x		x		
Vermehrung des Mesangiumstromas						x	x		x		x		
Niere:													
Eosinophile Ablagerungen im Bowman'schen Raum						x		x					
Blutung im Interstitium								x					
Degeneration u. Nekrose des Interstitiums													
Vakuolige Degeneration der Harnkanälchen							x	x	x		x		
Aktivierung des RES in der Rumpfniere							x						
Lymphatische Infiltration		x				x							
Leber:													
Degeneration u. Nekrose d. Hepatozyten			x				x						
Aktivierung des RES							x						
Kiem:													
Keulen-Gestalt													
Hypertrophie des respiratorischen Epithels						x							
Verklebung der Sekundärlamellen mit Hyperplasie d. Schleimzellen						x							

Tab. 11 Mikroskopische Befunde an den Organen intracardial
mit niedriger Dosis infizierter Fische (Gruppe 4)

Tag post infectionem	1	4	8	15	22	29	39	48	56	68	74	83	90
----------------------	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Milz:

Aktivierung des RES

x x

Kopfnieren:

Aktivierung des RES

x

Tab. 12 Mikroskopische Befunde an den Organen intracardial
mit hoher Dosis infizierter Fische (Gruppe 5)

[illegible]

Tab. 12 Mikroskopische Befunde an den Organen intracardial
mit hoher Dosis infizierter Fische (Gruppe 5)

<u>Tag post infectionem</u>	13	19	28	31	35	37	71	71	334	343
Milz:										
Schwellung und Zell- infiltration der Muskulatur			x	x			x			
Auge:										
Hyalinose, Myodegener- atio, Nekrose, Atrophie			x	x						
Granulome			x	x						
Entzündliche Infiltra- te im retrobulbären Fettgewebe			x	x						
Skelettmuskulatur:										
Schwellung und Zell- infiltration der Muskulatur			x	x	x			x	x	
Hyalinose, Myodegener- atio			x	x	x			x	x	
Phagozytierende Makro- phagen			x	x	x			x	x	
Kiem:										
Hypertrophie des res- piratorischen Epithels							x		x	
Verklebung der Sekun- därlamellen mit Hyperplasie der Schleim- zellen							x		x	
Gehirn:										
Meningitis							x			

III B 6. Bakteriologie

Gruppe 1 (Kontrollfische)

Für den Versuch wurden 13 Regenbogenforellen i.p. mit PBS infiziert. Alle Fische wurden bakteriologisch untersucht. Durch Anzucht konnten keine Bakterien isoliert werden; bei Abklatschpräparaten waren keine positiven Fluoreszenzen nachweisbar.

Gruppe 2 (i.p. infizierte Fische)

Für den Versuch wurden 13 Regenbogenforellen i.p. infiziert. Alle Fische wurden bakteriologisch untersucht. Durch Anzucht konnten in 2 Fällen am 22. und 90. Tag p.i. BKD-Bakterien isoliert werden; bei 12 Abklatschpräparaten war der Immunofluoreszenztest positiv. Am 29. Tag p.i. konnten keine Bakterien mittels IFAT nachgewiesen werden.

Gruppe 3 (i.m. infizierte Fische)

Für den Versuch wurden 13 Regenbogenforellen i.m. infiziert. Alle Fische wurden bakteriologisch untersucht. Durch Anzucht konnten in 4 Fällen am 15., 22., 39. und 74. Tag p.i. BKD-Bakterien isoliert werden; bei 7 Abklatschpräparaten war der Immunofluoreszenztest positiv. Am 1., 4., 8., 15., 29. und 90. Tag p.i. konnten keine Bakterien mittels IFAT nachgewiesen werden.

Gruppe 4 (intracardial mit niedriger Dosis infizierte Fische)

Für den Versuch wurden 13 Regenbogenforellen intracardial infiziert. Durch Anzucht konnten in 3 Fällen am 22., 39. und 90. Tag p.i. BKD-Bakterien isoliert werden; bei 8 Abklatschpräparaten waren deutliche Immunofluoreszenzen nachweisbar. In 5 Fällen zu Beginn des Versuches (am 1., 4., 8. und 15. Tag p.i.) und am Ende des Versuches (am 90. Tag p.i.) waren per IFAT keine Erreger nachzuweisen.

Gruppe 5 (intramardial mit hoher Dosis infizierte Fische)

Für den Versuch wurden 10 Regenbogenforellen intracardial infiziert. Alle Fische wurden bakteriologisch untersucht. Durch Anzucht konnten außer am 28. Tag in allen Fällen Bakterien isoliert werden; bei allen Abklatschpräparaten waren deutliche Immunofluoreszenzen nachzuweisen.

IV. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Histologische Veränderungen bei der bakteriellen Nierenerkrankung (BKD, Bacterial Kidney Disease) wurde bei Salmoniden der Genera *Oncorhynchus*, *Salmo* und *Salvelinus* beschrieben (KLONTZ, 1982; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985). Die meisten Veröffentlichungen beschränken sich auf Nierenveränderungen (EARP et al., 1953; SNIEZKO und GRIFFIN, 1955; SMITH, 1964; YOUNG und CHAPMAN, 1978).

Über Herzveränderungen gibt es nur wenige Literaturhinweise. Kurze Beschreibungen wurden von HOFFMANN et al. (1986) und BRUNO und MUNAKO (1986) gegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Regenbogenforellen i.m., i.p. und intracardial (i.c.) infiziert, um klinische und histopathologische Veränderungen zu vergleichen. Nur bei intracardial mit hoher Dosis infizierten Fischen traten Todesfälle am 31. und 37. Tag p.i. auf. Diese Fische färbten sich auch dunkel und sonderten sich ab. Allgemein waren Appetitabnahme und Mattigkeit ab dem 3. Tag p.i. zu beobachten. Diese Krankheitserscheinungen sind nicht typisch für Feldverlaufsformen (HOFFMANN und PFEIL-PUTZIEN, 1985). Der moribunde, am 71. Tag getötete Fisch zeigte Drehbewegungen. Als morphologisches Äquivalent wurde eine Meningitis beobachtet. Über neurologische Symptome bei spontanen BKD-Infektionen wurde bisher nicht berichtet. Diese Veränderungen korrespondieren mit Veränderungen im ZNS bei experimentell mit BKD-infizierten pazifischen Sablefischen (BELL et al.). HOFFMANN et al. (1984) berichteten, daß bei *Salmo gairdneri* die retrobulbäre Region besonders betroffen ist. Hier treten Panophthalmien, oft verbunden mit Verlust von Linse und Glaskörper, ausgedehnte fibrozytenreiche Granulome mit zahlreichen bakterienhaltigen Makrophagen, die teils den N. opticus umsäumen, auf. Fische, die intracardial mit hoher Dosis infiziert wurden, zeigten entsprechende Veränderungen. Der bevorzugte Infektionsweg vom Herzen aus, läßt sich damit erklären, daß bei Fischen Blut vom Herzen via Kiemen und Pseudobranchie direkt in das Auge gelangt (FISCHER, 1984).

Alle infizierten Fische zeigten mehr oder weniger starke vakuolige Nekrosen in allen Organen. Diese Veränderungen lassen sich möglicherweise auf Endotoxine bzw. endotoxinwirksame Substanzen aus der Zellwand von *Renibacterium salmoninarum* zurückführen. Ähnliche morphologische Veränderungen wurden bei endotoxin-bedingten Erkrankungen von

Säugetieren regelmäßig beobachtet. (HOFFMANN, 1976). Nach KUSSER und FIEDLER (1983) sowie NADER (1987) enthält *Renibacterium salmoninarum* eine außergewöhnlich dicke Polysaccharidschicht. Weiterhin konnte von Nader (1987) ein Glykoprotein mit 60 kD isoliert werden, das toxische Wirkungen hat. Dies wird als Exotoxin sezerniert. Polysaccharid und Exotoxin zusammen bewirken offensichtlich die pathologischen Veränderungen bis hin zur Granulombildung, induzieren aber auch die humoralen und zellulären Abwehrmechanismen (CHEN et al., 1978; FIEDLER und DRAXL, 1986). In wie weit es zusätzlich durch die Bildung von Immunkomplexen, die sich in Gefäßnähe (Herz, Niere) ablagern, zu entzündlichen Erscheinungen kommt, ist unklar. Die nahezu regelmäßig bei chronischer BKD vorkommende Glomerulonephritis (KETTLER, 1987) ist aber vermutlich auf derartige Komplexe zurückzuführen. HOFFMANN et al. (1986) beschrieben bei an BKD erkrankten Forellen, begrenzte chronische, vorwiegend lymphozytäre Myokarditiden, die bevorzugt im Ventrikel lokalisiert waren. Diese Myokarditiden wurden nur bei chronisch kranken Fischen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit bei i.m., i.p. und intracardial infizierten Fischen sehr schnell eine Herzmuskeldegeneration beobachtet. Sie trat zuerst bei i.m. infizierten Fischen auf. Die Ursache davon könnte sein, daß Bakterien über verletzte Kapillaren schnell ins Herz gelangen, wogegen bei der intracardialen Injektion die Mehrzahl der Bakterien im Herzbeutel verbleibt.

Makroskopisch konnte man deutliche Veränderungen in der Gruppe 5, die intracardial mit hohen Dosen infiziert war, erkennen. Geringfügige Fibrinniederschläge konnten wohl noch abgebaut werden, wobei als Endzustand Sehnenflecken entstanden. Bei den i.p., i.m. und intracardial mit niedriger Dosis infizierten Fischen, wurden Veränderungen, wie HOFFMANN et al. (1985) bei Feldfällen beschrieben haben, beobachtet. Myokarditiden treten auch bei Furunkulose (KUBOTA et KAMATA, 1971; MIYAZAKI et KUBOTA, 1975 a), Rotmaulkrankheit (RUCKER, 1966; WOBESER, 1973), Vibriosen (SAITO et al., 1964), sowie nach Virusinfektionen wie VHS (BESSE et al., 1965 b; GHITTINO, 1965, 1967, 1968, 1973; YASUTAKE und RASMUSSEN, 1968; SCHÄPERCLAUS, 1969; YASUTAKE, 1970; AMLACHER, 1976; HOFFMANN et al., 1979 b; WIZIGMANN und HOFFMANN, 1982) oder SVC (FIJAN, 1973) auf. Während bei viralen

Affektionen eine durch das Virus direkt bedingte Myokarddegeneration bzw. Nekrose (HOFFMANN und WIZIGMANN 1985) das Bild bestimmen, werden bei den oben angeführten bakteriellen Infektionen Toxine der Bakterien pathogenetisch verantwortlich gemacht.

Im Falle der BKD scheinen nach obigen Ausführungen beide Pathogenitätsmechanismen eine Rolle zu spielen. Der Nachweis von sich vermehrenden Bakterien im Herzen selbst, insbesondere bei der akuten septikämischen Form kann diese lokale Wirkung belegen. Die aus Feldfällen bekannte, regelmäßig auftretende vorwiegend lymphozytäre Myokarditis deutet dagegen eher auf eine Toxinwirkung.

Daß hierbei mitunter auch ausgeprägte Granulome mit Bakteriennachweis parallel gefunden wurden, zeigt aber, daß beide Faktoren gleichzeitig auftreten können.

KETTLER (1987) beschrieb, daß es auf die typische Polysaccaridschicht des BKD-Erregers zurückzuführen ist, daß das Bakterium wie auch BRUNO und MUNRO (1986) im Bakterienausstrich feststellten, deutlich PAS-positiv reagiert. Durch eigene Untersuchungen wurde bestätigt, daß die PAS-Reaktion hervorragend geeignet ist zur Darstellung von *Renibacterium salmoninarum* (auch im phagozytierten Zustand) bei der PAS-Reaktion, ist selbst eine geringe Anzahl der Erreger im histologischen Schnitt schnell zu erkennen, auch wenn noch keine Gewebsreaktionen sichtbar sind. Kombiniert mit der bakteriologischen Untersuchung, stellt die PAS-Reaktion am histologischen Schnitt eine sehr gute Nachweismethode dar (KETTLER, 1987).

Um eine sichere und spezifische Diagnose erstellen zu können, wurde in dieser Arbeit der fluoreszenzserologische Nachweis am Paraffinschnitt verbessert. Außerdem wurde die Immunperoxidase-Färbung für den BKD-Nachweis eingeführt. Durch die Variation der Immunfluoreszenztechnik, ist es möglich das BKD-Bakterium ähnlich brilliant im Paraffinschnitt wie im Abklatschpräparat darzustellen. So läßt sich *Renibacterium salmoninarum* auch im phagozytierten Zustand deutlich beobachten. Die Immunperoxidase-Färbung kann nicht nur lichtmikroskopisch, sondern könnte auch elektronenmikroskopisch Verwendung finden. Dies ist mit der Immunfluoreszenz nicht möglich.

Außerdem sind HRP-gefärbte Schnitte beliebig lange haltbar (DAB). Und es ist möglich, durch Kernfärbung den Gewebsverband sichtbar zu machen. Auch die hohe Empfindlichkeit spricht für die Immunperoxidase-Färbung als zukünftig zu verwendende Methode, insbesondere bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

V. Zusammenfassung

Die bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD) bewirkt unter Anderem eine massive Kardiopathie bei Salmoniden. Die histologischen Veränderungen lassen sich auf eine direkte Wirkung der Bakterien und eine Toxinwirkung zurückführen:

In der vorliegenden Arbeit wurden 62 Regenbogenforellen i.m., i.p. oder intracardial infiziert. Die Fische wurden nach Zeitplan getötet und bakteriologisch, histologisch, elektronenoptisch sowie immunhistologisch untersucht.

An klinischen Befunden wurde erhoben:

Abdunkelung, Mattigkeit sowie zentralnervöse Störungen.

Bei fast allen infizierten Fischen konnte das Bakterium rückisoliert werden. Histologisch waren eine vakuolige Degeneration, Ödeme, Blutungen, Granulome und Nekrosen besonders am Herzen nachweisbar. Begrenzte, vorwiegend lymphozytäre Myokarditiden traten sehr früh, bevorzugt im Ventrikel auf.

Immunhistologisch ließ sich *Renibacterium salmoninarum* deutlich in allen infizierten Organen darstellen.

VI. Summary

Studies on the Pathogenesis of bacterial kidney disease (BKD) of salmonid fish with special regard of the heart.

The bacterial kidney disease (BKD) causes among other symptoms a massive cardiomyopathy in salmonids.

Histological changes can be correlated to a direct influence of the bacteria and to a toxin effect. In this paper, 62 rainbow-trout were infected i.m., i.p. or intracardially. Fish were killed after a shedule and examined by histological, electron-microscopical and immunehistological methods.

Clinical findings were:

Darkening, drowsyness and central nervous disorder. The bacterium could be reisolated from nearly all infected fish.

Vacuolation, edema, bleedings, granuloma and necrosis could be demonstrated in the heart. Small, mainly lymphocytic myocarditis occurred early in the heart muscle.

Renibacterium salmoninarum was clearly demonstrable in all infected organs by immunehistological methods.

VII. Literaturverzeichnis

Aldrin, J.F., Mevel, M. und Robert J.Y. (1977):

Premières observations sur la corynébactériose
des salmonidés en Bretagne.

Bull. Off. int. Epiz. 87, 499 - 503

Amlacher, E. (1981):

Taschenbuch der Fischkrankheiten. 4. Auflage,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Amlacher, E. (1986):

Taschenbuch der Fischkrankheiten. 5. Auflage,
Gustav Fischer Verlag, Jena

Anderson, D.P. und Klontz, G.W. (1970):

Precipitating antibody against aeromonas salmo-
nicida in serums of inbred albino rainbow trout
(Salmo gairdneri)

J. Fish. Res. Board Can. 27, 1389 - 1393

Austin, B. und Rodgers, C.J. (1980):

Diversity among strains causing bacterial kidney
disease in salmonid fish.

Curr. Microbiol. 3, 231 - 235

Austin, B., Embley, T.M. und Goodfellow, M. (1983):

Selective isolation of Renibacterium salmoninarum.

FEMS Microbiol. Lett. 17, 111 - 114

Austin, B. (1985):

Evaluation of antimicrobial compounds for the con-
trol of bacterial kidney disease in rainbow trout,
Salmo gairdneri Richardson.

J. Fish. Dis. 8, 209 - 220

Avtalion, R.A., Wojdani, A., Malik, Z., Shahrabani, R. und

Duczyminer, M. (1973):

Influence of environmental temperature on the
immune response in fish.

Curr.Top. Microbiol. Immunol. 61, 1 - 35

Banner, C.R., Rohovec, J.S. und Fryer, J.L. (1983):

Renibacterium salmoninarum as a cause of mor-
tality among chinook salmon in salt water.

J. World Maricult. Soc., 14, 236 - 239

Banner, C.R., Long, J.J., Fryer, J.L. und Rohovec, J.C. (1986):

Occurrence of salmonid fish infected with
Renibacterium salmoninarum in the Pacific
Ocean

J.Fish Dis. 9, 273-275

Belding, D.L. und Merrill B. (1935):

A preliminary report upon a hatchery disease
of the salmonidae.

Trans. Am. Fish. Soc. 65, 76 - 84

Bell, G.R. (1961):

Two epidemics of apparent kidney disease in
cultured pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*)

J. Fish. Res. Board Can. 18, 559 - 562

Bell, G.R., Hoffmann R.W. und Brown L.L.

Pathology of experimental infections of the
sablefish (*Anaplopoma fimbria*) with Renibac-
terium salmoninarum, the agent of bacterial
kidney disease in salmonids

J. Fish. Dis. (im Druck)

Besse, P., Levaditi, J.C., Guillon, J.C. und de Kinkelin, P.

(1965):

Occurrence of viral diseases in the rainbow
trout hatcheries in France. First histopatholo-
gical results.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 126 (Art.1), 543 - 546

Brown, R.C. und Hopps, H.C. (1973):

Staining bacteria in tissue sections:
A reliable Gram stain method.
Am. J. Clin. Pathol. 60, 234 - 240

Bruno, D.W. und Munro, A.L.S. (1982):

Detection of the causative agent of bacterial kidney disease.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2, 11 - 12

Bruno, D.W. und Munro, A.L.S. (1986):

Uniformity in the biochemical properties of *Renibacterium salmoninarum* isolates obtained from several sources.
FEMS Microbiol. Lett., 33, 247 - 250

Bullock, G.L. und Snieszko S.F. (1969):

Bacteria in blood and kidney of apparently healthy hatchery trout.
Trans. Am. Fish. Soc. 98, 268 - 271

Bullock, G.L. Conroy, D.A. und Snieszko S.F. (1971):

Bacterial Diseases of Fishes.
In: Bullock, G.L. and H.R. Axelrod, Diseases of Fishes, Book 2A, T.F.H. Publications, New York, Toronto

Bullock, G.L., Stuckey, H.M. und Chen, P.K. (1974):

Corynebacterial kidney disease of salmonids: Growth and serological studies of the causative bacterium.
Appl. Microbiol. 28, 811 - 814

Bullock, G.L. und Stuckey, H.M. (1975):

Fluorescent antibody identification and detection of the corynebacterium causing diseases of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 32, 2224 - 2227

- Bullock, G.L., Griffin, B.R. und Stuckey H.M. (1980):
Detection of corynebacterium salmoninus by
direct fluorescent antibody test.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 719 - 721
- Chen, P.K., Bullock, G.L., Stuckey, H.M. und Bullock A.C. (1974):
Serological diagnosis of corynebacterial kidney
disease of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 31, 1939 - 1940
- Christensen, P., Kahlmeter, G., Jonsson, S. und Kronvall G. (1973):
New method for the serological grouping of
streptococci with specific antibodies adsorbed
to protein A-containing staphylococci.
Inf. Immun. 7, 881 - 885
- Cipriano, R.C., Starliper, C.E. und Schachte, J.H. (1985):
Comparative sensitivities of diagnostic procedures
used to detect bacterial kidney disease
in salmonid fishes. J. Wildl. Dis. 21, 144 - 148
- Coons, A.H., Creech, H.J. und Jones R.N. (1941):
Immunological properties of an antibody containing
a fluorescent group.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 47, 200
- Coons, A.H., Creech H.J., Jones, R.N. und Berliner E. (1942):
The demonstration of pneumococcal antigen in
tissues by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45, 159
- Earp, B.J., Ellis, C.H. und Ordal, E.J. (1953):
Kidney disease in young salmon.
Wash. Dept. Fish. Spec. Rep. Ser. Nr. 1, 74 S.

Edward, E.A. und Larson, G.L. (1974):

An new method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci.

Appl. Microbiol. 28, 972 - 976

Egusa, S. (1984):

Sakana no Kansensho, verbesserte Auflage,
(Infektiöse Erkrankungen der Fische),
Koseishakoseikaku Tokio

Ellis, A.E., McVicar, A.H. und Munro, A.L.S. (1982):

A preliminary report on the epidemiology of proliferative kidney disease in brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*) in Scotland.

Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 2, 13 - 15

Ellis, R.W., Novotny, A.J. und Harrell L.W. (1978):

Case report of kidney disease in a wild chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, in the sea.

J. Wildl. Dis. 14, 120 - 123

Evelyn, T.P.T., Hoskins, G.E. und Bell, G.R. (1973):

First record of bacterial kidney disease in an apparently wild salmonid in British Columbia.

J. Fish. Res. Board Can. 30, 1578 - 1580

Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J.E. und Prosperi-Porta L. (1981):

The clinical significance of immunofluorescence-based diagnoses of the kidney disease carrier.

Fish Pathol. 15, 293 - 300

Evelyn, T.P.T., Prosperi-Porta, L. und Ketcheson J.E. (1984):

The salmonid egg as a vector of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*.
Fish Diseases-Enfermedades de los Peces, Fourth
COPRAQ Session, Cadiz 1981, Hrsg. Acuigrup,
Spanien

Fiedler, F. und Draxl, R. (1986):

Biochemical and immunochemical properties of
the cell surface of *Renibacterium salmoninarum*.
J. Bakt. 168, 799 - 804

Fijan, N. (1973):

Spring viraemia of carp (SVC) - A review.p.
119 - 123 in W.A.Dill (ed.) Symposium on the
major communicable fish diseases in Europe and
their control.
FAO, EIFAC Tech.Pap. 17, Suppl. 2.

Fijan, N. (1977):

Corynebacteriosis (dee disease, kidney disease)
of salmonids in Yugoslavia.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 509

Fischer, Th. (1984):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen
an Kiemen und Pseudobranchie der Goldorfe
(*Leuciscus idus* L.)
Diss. med. vet. München

Fletcher, T.C. und Grant, P.T. (1969):

Immunoglobulins on the serum and mucus of the
plaice (*Pleuronectes platessa*).
Biochem. J. 115, 65

Forsgren, A. und Sjöquist, J. (1966):

Protein A from staphylococcus aureus.
J. Immunol. 97, 822 - 827

Fryer, J.L. und Sanders, J.E. (1981):

Bacterial kidney disease of salmonid fish.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 237 - 298

Ghittino, P. (1965):

Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. Ann.N.Y.Acad.Sci. 126
(Art.1), 463 - 478

Ghittino, P. (1967):

La Setticemia Emorragia Virale (SEV) della trota iridea de allevamento. Riv.It.Piscic. Ittiopatol. 2, 90 - 102

Ghittino, P. (1968 a):

Les maladies contagieuses des poissons incluses dans le Code Zoosanitaire International des Epizooties, 72pp.

Ghittino, P. (1973):

Viral hemorrhagic septicemia (VHS). p.4-11 in W.A. Dill (ed.) Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control.
FAO, EIFAC, Tech. Pap. No. 17, Suppl. 2.

Ghittino, P., Andruetto, S. und Viglani E. (1977):

Recent findings in trout kidney pathology in Italy.
Bull. Off. int. Epiz. 37, 491 - 493

Graham, R.C. und Karnovsky, M.J. (1966):

The early stages of injected horseradish peroxidase in the tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291

Hendricks, J.D. und Leek, S.L. (1975):

Kidney disease postorbital lesions in spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).
Trans. Am. Fish. Soc. 104, 805 - 807

Hoffmann, R. (1976):

Syndrome disseminierter intravasaler Gerinnung
(Verbrauchscoagulopathie)
Fortschritte in der Veterinärmedizin Vol. 24

Hoffmann, R., van de Graaf, S. und Burg G. (1983):

Verbreitung der Tuberkulose bei Zierfischen
Tierärztliche Prax. 11, 261 - 267

Hoffmann, R., Pfeil-Putzien, C., Dangschat, H. und Vogt, M. (1979 b):

Untersuchungen zur Pathogenese der viralen Hä-
morrhagischen Septikämie (VHS) bei Regenbogen-
forellen (*Salmo gairdneri*).
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 180 - 185

Hoffmann, R. und Pfeil-Putzien C. (1986):

Bacterial Kidney Disease (BKD) bei Salmoniden.
Tierärztl. Prax. 14, 283 - 289

Hoffmann, R., Popp, W. und van de Graaf, S. (1984):

Atypical BKD predominantly causing ocular and
skin lesions.
Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 4, 7 - 9

Hoffmann, R. und Wizigmann G. (1984):

Comparative histological and immunohistological
studies in VHS
in Fish Diseases, Fourth Coprag Session ed. by
Acuigrup, Cadiz, 29 - 34, Spain

Hsu, S.-M. und Soban, E. (1982):

Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic irons and its application for double immunohistochemistry.

J. Histochem. 30, 1079 - 1082

Hunn, J.B. (1964):

Some patho-physiological effects of bacterial kidney disease in brook trout.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 117, 383 - 385

Ino, N., Sato, Y. und Hirohashi, E. (1984):

ABC Methode to PAP Methode o heiyō shita Kosokotaiho no Nijusenshoku to sono Hasshokuho no Kento.

Eyori to Rinsyo 1, 1475 - 1479

Iwama, G.K. und Greer, G.L. (1980):

Effect of bacterial infection on the toxicity of sodium pentachlorophenate to juvenile coho salmon.

Trans. Am. Fish. Soc. 109, 290 - 292

Kaatari, S., Blaustein, K., Turuga, P., Irwin, M. und Weins G. (1986):

Development of a vaccine for bacterial kidney disease. In Salmon Annual Report prepared for U.S. Dept. Energy. Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildfish. Portland, Or. U.S.A.

Kettler, S., Hoffmann, R. und Pfeil-Putzien, C. (1986):

Infection of grayling (*Thymallus thymallus*) with the agent of bacterial kidney disease.

Full.Eur. Ass. Fish Pathol. 6, 69 - 71

Kettler, S. (1987):

Histologische Untersuchungen zur BKD der Salmoniden.
Diss. med.vet., München

Kieser, D. und Hoskins, G.E. (1983):

Control of overt bacterial kidney disease in adult salmonids by erythromycin injection.
Informal Memo No. 67. Pacific Biological Station, Nanaimo, Canada

Kimura, T. und Awakura, T. (1977):

Bacterial kidney disease of salmonids: First observation in Japan.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 143 - 150

Kimura, T. (1978):

Bacterial kidney disease of salmonids.
Fish Pathol. 13, 43 - 52

Kimura, T. und Yoshimizu, M. (1981 a):

Rapid method for detection of bacterial kidney disease of salmonid (BKD) by coagglutination of antibody sensitized protein A-containing staphylococci.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 1173 - 1183

Kimura, T. und Yoshimizu, M. (1981 b):

A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial kidney disease (BKD).
International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W.Va., U.S.A. 1981, Develop. biol. Standard. 49, S. Karger, Basel

Kinkel, de, P. (1974):

Corynébactériose des salmonidés: première observation en France. Bull. Franç de Piscicult. 254
3 - 8

Klontz, G.W. (1972):

Haematological techniques and the immune response in rainbow trout.
Symp. Zool. Soc. Lond. 30, 89 - 99

Klontz, G.W. (1978):

Prevention of bacterial kidney disease in adult and juvenile salmonids.
Proc. Joint 3rd Biennial Fish Health Section and 9th Annual Midwest Fish Workshop. Kansas, U.S.A.

Klontz, G.W. (1982):

Bacterial kidney disease in Salmonids. An overview. Presented at: The International Symposium on the Antigens of Fish Pathogens: Development and Production of Vaccines and Serodiagnostics. May 1982, Talloires, France

Kobayashi, K., Hara, A., Takano, K. und Hirai, H. (1982):

Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon *Oncorhynchus keta*.
Molec. Immun. 19, 95 - 103

Kubota, S.S. und Kamata, T. (1971):

Histological studies on furunculosis-I.
(*Oncorhynchus rhodurus* var. *macrostomus*)
Fish Path. 5, 116 - 119

Kusser, W. und Fiedler, F. (1983):

Murein type and polysaccharide composition of cell walls from *Renibacterium salmoninarum*.
FEMS Microbiol. Lett. 20, 391 - 394

Laidler, L.A. (1980):

Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique.
J. Fish. Dis. 3, 67 - 69

Lallier, R., Olivier, F., Chartier, P., Turcotte, C.,

Dion, B. und Paulhus, J. (1981):
Presence of bacterial kidney disease in salmonid fish in Quebec.
Can. Vet. J. 22, 226 - 229

Lillie, R.D. (1948):

Histopathologic Technique
The Blackiston Co., Philadelphia

Litmann, G.W. (1975):

Physical properties of immunoglobulins of lower
species: A comparison with immunoglobulins of
manmalls.

In: Marchalonis, J.J., Comparative Immunology,
Blackwell, Oxford

Mackie, T.J., Arkwright, J.A. und Pryce-Tannatt, T.E. (1933):

Second Interim Report of the Furunculosis Committee.
His Majesty's Stationary Off., Edinburgh, Scotland

MacLean D.G. und Yoder, W.G. (1970):

Kidney disease among Michigan salmon in 1967
Prog. Fish Cult. 32, 26 - 30

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (1977 a):

Virologische Arbeitsmethoden, Bd.I, Gustav-Fischer
Verlag, Stuttgart, New York

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (1977 b):

Virologische Arbeitsmehtoden, Bd.II, Gustav Fischer
Verlag, Stuttgart New York

Meadows, R. (1973):

Renal histopathology; a light microscopy study
of renal disease.
Oxford Univ.Press.
New York

Millan, L.M. (1977):

New diseases in Salmon culture in Spain.
Pull. Off. int. Epiz. 87, 515 - 516

Mitchum, D.L. und Sherman, L.E. (1981):

Transmission of bacterial kidney disease from
wild to stocked hatchery trout.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38, 547 - 551

Miyazaki, T. und Kubota, S.S. (1975):

Histological studies on Furunculosis-II.
(*Oncorhynchus rhodurus* var. *macrostomus*)
Fish Path. 2, 204 - 214

Nader, H. (1987):

Biochemie der Immunogenität und Pathogenität
von *Renibacterium salmoninarum*
Diplomarbeit München

Ordal, E.J. und Earp, B.J. (1956):

Cultivation and transmission of the etiological
agent of kidney disease in salmonid fishes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 85 - 88

Ouchterlony, Ö. (1958):

Diffusion-in-gel methods for immunological ana-
lysis. In: Kallos, P., Progress in Allergy Vol V,
Karger Verlag, Basel und New York

Ouchterlony, Ö. (1962):

Diffusion-in-gel methods for immunological ana-
lysis. In: Kallos, P. und B.H. Waksman, Progress
in allergy Vol. VI, Karger, Basel und New York

Ouchterlony, Ö. und Nilsson, L.A. (1973):

Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
In: Weir, D.M., Handbook of experimental immuno-
logy, Blackwell Scientific Publications, London

Pascho, R.J. und Mulcahy D. (1987):

Enzyme linked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonid.

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 183 - 191

Paterson, W.D., Gallant, C., Desautels, D. und Mashall L. (1979):

Detection of bacterial kidney disease in wild salmonids in the margaree river system and adjacent waters using a indirect fluorescent antibody technique.

J. Fish. Res. Board Can. 36, 1464 - 1468

Paterson, W.D., Desautels, D. und Weber, J.M. (1981 a):

The immune response of atlantic salmon, *Salmo salar* L., to the causative agent of bacterial kidney disease, *Renibacterium salmoninarum*.

J. Fish. Dis. 4, 99 - 111

Paterson, W.D., Lall, S.P. und Desautels, D. (1981 b):

Studies on bacterial kidney disease in atlantic salmon (*Salmo salar*) in Canada.

Fish. Pathol. 15, 283 - 292

Pfeil-Putzien, C., Hoffmann, R. und Popp, W. (1985 a):

Preliminary report on the occurrence of BKD in Germany. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2, 30 - 31

Pfeil-Putzien, C., Hoffmann, R., Popp, W. und Schauner, M. (1985 b):

Zur Verbreitung der Bacterial Kidney Disease (BKD) der Salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland.

Zbl. Vet. Med. B 32, 541 - 547

Pippy, J.H. (1969):

Kidney disease in juvenile atlantic salmon
(*Salmo salar*) in the Margaree River.
J. Fish Res. Board Can. 26, 2535 - 2537

Roberts, R.J. u. Schlotfeldt, H.J. (1985):

Grundlagen der Fischpathologie.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Rucker, R.R., Earp, B.J. und Ordal, E.J. (1953):

Infectious Diseases of Pacific Salmon.
Trans. Am. Fish. Soc. 83, 297 - 312

Rucker, R.R. (1966):

Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
Bull. Off. Int. Epiz. 65, 325 - 330

Saito, Y., Otsuru, M., Furukawa, T., Kanda, K., und Sato,

A. (1964):

Studies on an infectious disease of rainbow-trouts.
Acta Medica et Biologica 11, 267 - 295

Sakai, M., Koyama, G., Atsuta, S. und Kobayashi, M. (1987):

Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a Modified Peroxidase-antiperoxidase (PAP) Procedure
Fish Pathology 22 (1) 1 - 5, 3

Sakai, M., Amaaki, N. und Kobayashi, M. (1987):

Comparative sensitivities of several dot blot
methods used to detect bacterial kidney diseases.
J. Fish Diseases 10, 229 - 231

Sanders, J.E. und Fryer, J.L. (1980):

Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the
causative agent of bacterial kidney disease in
salmonid fishes.
Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 496 - 502

Schäperclaus, W. (1969):

Virusinfektion bei Fischen S. 1067 - 1141 in H.
Röhner (ed.) Handbuch der Virus-Infektionen bei
Tieren.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Schäperclaus, W. (1979):

Fischkrankheiten 4. Aufl., Akademie Verlag,
Berlin

Schauner, M., Hoffmann, R. und Pfeil-Putzien, C. (1985):

Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden
(BKD) als Problem der Forellenteichwirtschaft.
Fischer und Teichwirt 36, 162 - 164

Schauner, M. (1985):

Untersuchung zum serologischen Nachweis der Bak-
teriellen Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden.
Vet.-med. Diss., München

Shelton, E. und Smith, M. (1970):

The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*)
Immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin
J. Mol. Biol. 54, 615 - 617

Smith, I. W. (1964):

The occurrence and pathology of Dee Disease.
Freshwater and Salmon Fisheries Research 34, 3-9

Snieszko, S.F. und Griffin, P.J. (1955):

Kidney Disease in brook trout and its treatment.
Progr. Fish Cult. 17, 3 - 13

Stanworth, D.R. und Turner, M.W. (1973):

Immunochemical analysis of immunoglobulins and
their subunits.
In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immuno-
logy Bd. 1, 2. Auflage, Blackwell Scientific Pub-
lications, London

Taylor, R.D. (1966):

Modification of the Brown and Brenn gram stain for the differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections.

Am. J. Clin. Pathol. 46, 472 - 474

Vigneuille, M., Baudin-Laurencin, F. und Mevel, M. (1977):

Premières observations sur la Corynebactériose des Salmonidés en Bretagne. Epidémiologie.

Bull. Off. Int. Epiz. 37, 497 - 498

Warren, J.W. (1963):

Kidney disease of salmonid fishes and the analysis of hatchery waters.

Prog. Fish Cult. 25, 121 - 126

Warren, J.W. (1983):

Bacterial kidney disease.

In: A guide to integrated fish health management in the great lakes basin, Great Lakes Fishery

Commission, Michigan, April 1983

Wedemeyer, G.A. und Ross, A.J. (1973):

Nutritional factors in the biochemical pathology of corynebacterial kidney disease in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

J. Fish. Res. Board Can. 30, 296 - 298

Wizigmann, G. und Hoffmann, R. (1982):

Untersuchungen bei der viralen hämorrhagischen Sepsis (VHS) der Regenbogenforelle.

Zbl. Vet.-Med. B, 29, 782 - 783

Wobeser, G. (1973):

An outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. Jour. Fish. Res. Board Can. 30, 571 - 575

Wolf, K. und Dunbar, C.E. (1959):

Tests of 34 therapeutic agents for control of
kidney disease in trout.

Trans. Am. Fish. Soc. 88, 117 - 124

Wolke, R.E. (1975):

Bacterial and fungal diseases.

In: Ribelin, W.E. und Migaki, G., Pathology of
Fishes,

University of Wisconsin Press

Wood, J.W. und Wallis, J. (1955):

Kidney disease in adult chinook salmon and its
transmission by feeding to young chinook salmon.

Res. Briefs Fish. Comm. Oregon 6, 32 - 40

Wood, E.M. und Yasutake, W.T. (1956):

Histopathology of kidney disease in fish.

Am. J. Path. 32, 845 - 857

Yamaguchi, N., Teshima, C., Kurashige, S., Saito, T. und

Mitsuhashi, S. (1980):

Seasonal modulation of antibody formation in rain-
bow trout (*Salmo gairdneri*).

In: Solomon, J.B. Aspects of Developmental and
Comparative Immunology I., Pergamon Press, Oxford

Yamamoto, T. (1975):

Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial
kidney disease appearing concurrently in populations
of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*.

J. Fish. Res. Board Can. 32, 92 - 95

Yasutake, W.T. und Rasmussen, C.J. (1968):

Histopathogenesis of experimentally induced viral
hemorrhagic septicemia in fingerling rainbow trout
(*Salmo gairdneri*)

Bull. Int. Epiz. 69, 977 - 984

Yasutake, W.T. (1970):

Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. 341 - 350 in S.F.

Snieszko (ed.).

A symposium on diseases of fishes and shellfishes. Spec. Pbul. No. 5, Amer. Fish. Soc., Washington, D.C. 526 pp.

Yasutake, W.T. (1970):

Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. P. 341 - 350 in S.F.

Snieszko (ed.). A symposium on diseases of fishes and shellfishes.

Spec. Pbul. No. 5, Amer. Fish. Soc., Washington, D.C.

Young, C.L. und Chapman, G.B. (1978):

Ultrastructural aspects of the causative agent and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Can. 35, 1234 - 1243

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche Unterstützung bei Erstellung und Korrektur der Arbeit.

Eine große Hilfe war mir die persönliche Beratung und sachliche Anleitung von Frau Dr. C. Pfeil-Putzien, der ich hiermit besonders danken möchte.

Recht herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. T. Fischer - Scherl, die mir mit großem Engagement die Arbeit am Elektronenmikroskop ermöglichte und für ihre immer gern gewährte Hilfestellung während der Erstellung der Arbeit.

Frau Dr. Dr. habil. Hoffmann - Fezer sei herzlichst für ihre Unterstützung gedankt.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zoologie und Hydrobiologie danke ich sehr herzlich für ihre gute Zusammenarbeit.

Frl. R. Reitmeier für ihre Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit, Frau B. Klumpp für die Hilfe bei lichtmikroskopischen Arbeits- und Färbemethoden und Frau S. Friedrich für die Anfertigung der Ultradünnschnitte.

Die Herstellung der Abzüge für die Fotos der Arbeit konnte durch die freundliche Hilfe von Herrn Seibt von der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung erfolgen.

Durch die sorgfältige Betreuung der Versuchsfische durch Herrn Busch wurde der reibungslose Ablauf der Infektionsversuche gewährleistet, hierfür möchte ich ihm sehr herzlich danken.

Lebenslauf

Name: Masahiro Ogawa

geb.: 18. März 1958

Eltern: Syozo Ogawa
Masako Ogawa, geb. Okamoto

Schulbildung: 1964 - 1970 Volksschule Matsunami
1970 - 1973 Junior High School Matsunami
1973 - 1976 High School Kamakuragakuen

Studium: SS 1979 - WS 1985 Tiermedizin an der N.V.Z.C.
Tokio
Abschluß-Staatsexamen März 1985

Dissertation: Ab Juni 1985 am Institut für Zoologie
und Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

